

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA
V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra farmaceutické technologie

Nosní přípravky. Transnasální aplikace.
Nasal preparations. Transnasal application.
Diplomová práce

„ Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem pro zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu

V Hradci Králové 5. května, 2011

.....

Ráda bych poděkovala paní Doc.PharmDr. Zdeňce Šklubalové Ph.D. za její ochotu, připomínky a odbornou pomoc při vypracování této diplomové práce.

Obsah

1	Abstrakt	7
2	Abstract	8
3	Zadání	9
4	Úvod	10
5	Nosní aplikace léčiv	12
5.1	Nosní absorpce léčiv	13
5.1.1	Zvířecí modely pro studium nosní absorpce	15
6	Anatomie a fyziologie nosu	17
6.1	Stavba nosní dutiny	17
6.2	Cévní zásobení nosní dutiny	20
6.3	Inervace nosní dutiny	20
6.4	Fyziologie nosní dutiny	21
6.4.1	Nosní hlen	21
6.4.2	Nosní enzymy	22
6.4.3	Efluxní systém	23
6.4.4	Vliv cévního zásobení na intranasální absorpci	23
6.4.5	Nervová regulace	24
6.4.6	Nosní cyklus	25
6.4.7	Mukociliární transport	25
6.5	Patologické podmínky v nose	27
6.5.1	Chronická onemocnění	27
6.5.2	Akutní onemocnění	28
7	Faktory ovlivňující transnasální absorpci	29
7.1	Fyzikálně-chemické vlastnosti léčivé látky	29
7.1.1	Molekulová hmotnost	29
7.1.2	Rozpustnost	29
7.1.3	Lipofilita/hydrofilita	30
7.1.4	Disociační a rozdělovací koeficient	30

7.2	Fyzikálně-chemické vlastnosti přípravku	31
7.2.1	pH a dráždivost přípravku	31
7.2.2	Osmolarita	31
7.2.3	Viskozita a hustota	32
7.2.4	Fyzikální a chemická stabilita	32
7.2.5	Velikost částic	32
7.2.6	Lokalizace přípravku v nosní dutině	33
7.2.7	Aplikované množství přípravku	34
8	Lékové formy pro nosní aplikaci	35
8.1	Tekuté lékové formy	35
8.2	Práškové formy	35
8.3	Polotuhé lékové formy	36
8.4	Pomocné látky v nosních přípravcích	36
8.4.1	Rozpouštědla	37
8.4.2	Pufry	37
8.4.3	Antioxidanty	37
8.4.4	Korigencia chuti	37
8.4.5	Protimikrobní konzervační látky	38
8.4.6	Humektanty/Zvlhčovačla	39
8.5	Typy dávkovacích systémů	39
8.5.1	Systémy pro tekuté přípravky	39
8.5.2	Systémy pro práškové přípravky/Insuflátory	40
9	Transnasální aplikace peptidů	42
9.1	Insulin	42
9.2	Kalcitonin	46
9.3	Další léčivé látky peptidové nebo proteinové povahy	46
	Metody zvýšení biodostupnosti transnasálních peptidů	49
9.4	Změna chemické struktury	49
9.5	Inhibitory nosních enzymů	51
9.6	Látky usnadňující nosní absorpci	51

9.6.1	Cyklodextriny	52
9.6.2	Deriváty kyseliny fusidové.....	54
9.6.3	Kationické polymery	54
9.6.4	Membránou penetrující peptidy	57
9.6.5	Modulátory těsných spoju	58
9.6.6	Donory NO	59
9.6.7	N-acetyl-L-cystein	59
9.6.8	Tenzidy	60
9.6.9	Nerozpustné práškové přípravky	62
9.7	Částicové systémy	62
9.7.1	Liposomy	62
9.7.2	Mikročástice	64
9.7.3	Nanočástice	67
9.8	Bioadhezivní systémy	69
9.8.1	Mukoadhezivní prášky	69
9.8.2	Mukoadhezivní gely	70
10	Závěr.....	72
11	Použitá literatura.....	75

1 Abstrakt

Transnasální aplikace léčiv poskytuje zajímavý způsob v podání systémově účinných látek. Vysoká permeabilita nosní sliznice a rozsáhlé cévní zásobení a v nosní dutině jsou velmi vhodné předpoklady pro absorpci systémově účinných léčivých látek. Přesto má transnasální podání také svá omezení, mezi něž patří potenciální dráždivost pro nosní sliznici, limitovaný čas kontaktu přípravku s tkání a značná aktivita proteolytických enzymů. Rozsáhlou skupinu látek, jejichž transnasální transport v posledních letech zkoumán, patří peptidy. Většina peptidových léčiv není díky velké molekulové hmotnosti, hydrofilní struktuře a nízké schopnosti procházet membránami příliš dobře absorbována přes nosní sliznici. Tato rešeršní práce se zabývá faktory ovlivňujícími transport peptidů přes nosní sliznici a možnostmi ovlivnění nosní absorpce.

2 Abstract

Transnasal application of drugs offers an interesting way of the systemic administration of drugs. Both a high permeability of nasal mucosal tissue and a rich vascularity in a nasal cavity are good preconditions for systemic absorption of nasal drugs. Indeed, there are also the disadvantages associated with the nasal drug application, such as irritative potential of the preparation for nasal mucosa, limit in contact time, and a high activity of the proteolytic enzymes. Peptides represent the large group of nasal substances which are recently very intensively investigated. However, most of peptide drugs is not well absorbed through the nasal mucosa due to their large molecular weight, hydrophilic structure and the low mucosal membrane permeability. This review work deals with factors affecting the transport of peptide drugs through nasal mucosa and the possibilities of modifying of this absorption.

3 Zadání

Cílem této rešeršní diplomové práce je z dostupné aktuální literatury vypracovat přehled o nosní aplikaci léčiv. V jednotlivých částech práce by pozornost měla být věnována anatomii a fyziologii aplikačního místa, faktorům ovlivňujícím nosní aplikaci léčiv a nosním lékovým formám. Největší pozornost přitom bude věnovaná transnasálnímu podání se zaměřením na možnost aplikace peptidů a na faktory, které transnasální přestup peptidů limitují či naopak usnadňují.

4 Úvod

Léčivé látky mohou být podávány do organismu různými způsoby. Výběr vhodné aplikační cesty obvykle závisí na takových faktorech jako je klinický přínos léčby, vhodnost vybraného způsobu aplikace, vlastnosti léčiva a potřebný farmakologický profil.

V naléhavých situacích je upřednostňováno použití injekčních forem, zatímco v dlouhodobé terapii se dává přednost neinvazivním postupům.

Nejžádanější a nejvhodnější způsob podávání léčiv je orální cesta a nejoblíbenější léková forma zahrnuje tablety, tobolky a roztoky, z důvodu jejich snadné výroby a podání. V některých případech však není orální aplikace nejvýhodnější. Pokud je u léčiva vyžadován rychlý nástup účinku, je zpomalena činnost trávicího traktu, léčivo je špatně absorbováno z trávicího traktu, ve velké míře degradováno kyselým pH žaludku nebo enzymy v lumen nebo jaterním first-pass metabolismem, tak potom není orální podání možné. V posledních letech je tedy kladen stále větší důraz na výzkum dalších způsobů podávání systémově účinných látek. Mezi nejvíce zkoumané způsoby podání patří bukalní, nosní a plicní podání.

Bukální sliznice je normálně málo prostupná a absorpce může být pomalá. Podávání do plic poskytuje rychlý nástup účinku, ale tato cesta je často omezena velikostí dávky, dráždivostí některých sloučenin, a aby byl podaný přípravek účinný, musí být dosaženo alveolů. Intranasální podání může být tedy vhodnou volbou pro široké rozpětí léčivých látek.

Tabulka č.1 Způsoby podání léčivých látek a nejdůležitější vlastnosti¹

Důležité vlastnosti	Způsoby podání					
	Orální	i.v.	i.m./s.c.	Transdermální	Nosní	Plicní
Přechod do krve	nepřímý, absorpce přes GI trakt	přímý, bolus podaný do žily	nepřímý, absorpce ze svalové nebo podkožní tkáně	nepřímý, absorpce přes relativně nepropustnou pokožku	nepřímý, absorpce přes vysoce propustnou nosní sliznici	nepřímý, léčivo podáno přes rozsáhlý, vysoce propustný epitel
Způsob podání a možné problémy	podléhá trávicímu procesu,first-pass metabolismus	podání vyžaduje zdravotnického pracovníka	bolestivá injekce, může vyžadovat podání zdravotnickým pracovníkem	velmi variabilní, pomalé vstřebávání, možnost kožních reakcí	aplikace samotným pacientem, vyžaduje výbornou rozpustost	vyžaduje hlubokou, pomalou inhalaci malých částic aerosolu
Pohodlí pro pacienty	Vysoké	Nízké	Nízké	Střední	střední až vysoké	střední až vysoké
Nástup účinku	Pomalý	Rychlý	Mírný	Pomalý	rychlý	mírný až rychlý
Podávání makromolekul	Ne	Ano	Ano	Ne	ano	ano
Biologická dostupnost	nízká až vysoká	Standard	mírná až vysoká	Nízká	vysoká	mírná až vysoká
Kontrola podaného množství	Střední	Dobrá	Střední	Špatná	střední	střední až dobrá

5 Nosní aplikace léčiv

Intranasální podání léčiv se stává jedním z nejstudovanějších způsobů podávání léčiv. Už ve starověku byl tento způsob užíván při systémovém podávání psychotropních a halucinogenních sloučenin. V moderní farmakoterapii se nosní podávání léčivých látek používá spíše pro jejich lokální účinek než pro systémovou léčbu.

Nosní cesta podání je vhodná pro léčivé látky, u nichž je zapotřebí rychlý nástup účinku. Dále může být nosní podání preferovanou alternativou jiných aplikačních cest u nemocí, které vyžadují opakované podání léčivé látky, nebo u léčiv, u kterých je jiný způsob podání obtížný, např. u peptidů, proteinů nebo vakcín. V současnosti je tento způsob rozsáhle zkoumán a pomocí transnasálních léků je léčeno již několik nemocí nebo stavů, např. migréna a osteoporóza, a zároveň byly vyvinuty i očkovací látky proti chřipce a *H. influenzae*. Snadná přístupnost nosní dutiny usnadňuje samoléčení a tím zlepšuje compliance u pacientů ve srovnání s parenterálními cestami.

Výhody a nevýhody nosního podávání léčiv

Výhody:

- rozsáhlá plocha dostupná pro uložení a absorpci léčiv
- rychlá absorpce a vyšší biologická dostupnost, tudíž stačí nižší dávky léčiv
- rychlý nástup terapeutického účinku
- účinná látka není metabolizována v gastrointestinálním traktu
- účinná látka nedráždí trávicí trakt
- nižší riziko předávkování
- neinvazivní cesta podání, snižuje riziko infekce²

Nevýhody:

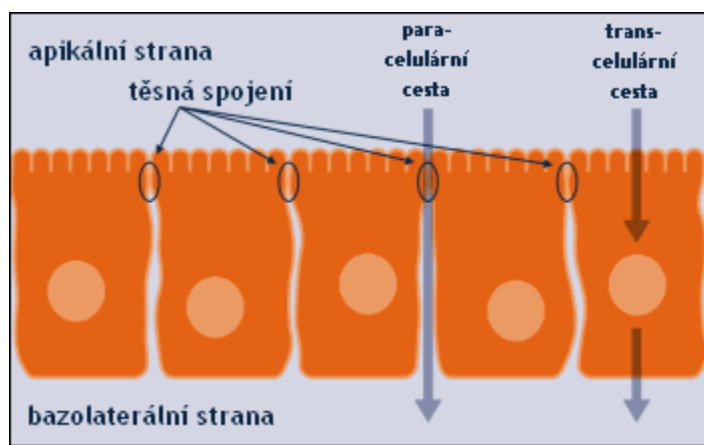
- nosní podání není vhodné pro všechna léčiva
- častým problémem je nedostatečná rozpustnost podávané látky ve vodném roztoku
- lze podat jen omezený objem léčiva najednou, většinou v rozmezí 25-200 μl^2
- přestože je nosní epithel velmi propustný, není absorpce pro hydrofilní látky a velké molekuly dostatečná
- některá léčiva mohou dráždit nosní sliznici
- ucpaní nosu kvůli nachlazení nebo alergiím může ovlivnit tento způsob podávání léčiv
- časté podávání léčiv touto cestou může mít za následek poškození sliznice a může vést k infekci nebo ztrátě čichu

5.1 Nosní absorpce léčiv

Nosní absorpce léčiv začíná v dýchacím oddílu zahrnujícím nosní skořepky a část nosní přepážky. První krok při absorpci léčivé látky z nosní dutiny je průchod přes hlenovou vrstvu, která chrání pod ní ležící sliznici a je důležitá pro mechanismus mukociliárního transportu. Studie transportu částic přes hlenovou vrstvu ukázala, že transport je závislý na velikosti a s rostoucí velikostí rychle klesá.³ Malé, nenabitě částice procházejí hlenem velice snadno. Velké a nabitě částice mají mnohem větší obtíže při procházení hlenovou vrstvou.⁴

Průchod léčivé látky přes nosní sliznici může probíhat 2 způsoby: prvním způsobem je transcelulární transport, který probíhá pasivní difúzí, aktivním, nosičem zprostředkovaným transportem nebo endocytózou. Pasivní difúze je vhodná pro malé a lipofilní molekuly, aktivního transportu se účastní např. P-glykoprotein, dopaminový transportér nebo aminokyselinové transportéry a endocytóza je vhodná pro přenos vakcín a peptidem obalených nanosfér.⁵

Druhým způsobem je paracelulární transport, který je důležitý pro absorpci peptidů a proteinů. Je uváděn do spojitosti s mezibuněčnými prostory a těsnými spoji.⁶ Rozměr mezibuněčných prostor se pohybuje mezi 10 a 30-50 Å. Těsné spoje neboli zonula occludens jsou strukturní jednotky složené z proteinových komplexů, které jsou spojené s apikálním aktin-myosinovým prstencem. Jedná se o dynamické struktury, které slouží dvěma hlavními funkcím: a) tvoří regulační bariéru v prostorách mezi buňkami, čímž omezují pohyb molekul, jako jsou malé ionty, přes buněčné listy, b) působí jako hranice v samotné plazmatické membráně, protože oddělují jednotlivé apikální a basolaterální buněčné domény.⁷



Obr.č.2 Možnosti transportu léčivé látky přes nosní sliznici⁸

Malé hydrofilní molekuly mohou pasivně procházet paracelulárními cestami mezi sousedními buňkami nosního epitelu. V tomto případě je pasivní difúze hydrofilních roztoků řízena koncentračním gradientem a míru absorpce určuje 1.Fickův zákon.⁶ Polární a nabitě sloučeniny s molekulovou hmotností nižší než 1 000 Da zřejmě procházejí přes nosní epitel tímto paracelulárním transportem.⁶

Faktor, který rozhoduje o způsobu přechodu léčiva přes sliznici, je lipofilita léčiva.⁹

5.1.1 Zvířecí modely pro studium nosní absorpce

Studie nosní absorpce se provádí převážně na dvou hlavních zvířecích modelech: model celého zvířete a model izolovaného promývaného orgánu.

Nejrozšířenějším zvířecím druhem pro testování intranasální aplikace léčiv je potkan. Studie ukazují, že u většiny léčiv (nepeptidových) výsledky získané na potkanech přesně předpovídají absorpční profily léčiv u lidí.⁹

Při metodě *in situ* je promývací roztok zaváděn do nosní dutiny pomocí trubičky vložené přes jícen do zadní části nosní dutiny. Při této metodě cirkuluje roztok léčiva v nosní dutině působením kontinuální pumpy. Míra absorpce je určována opakovanou analýzou množství zbývajících léčiva v perfúzním roztoku.¹⁰

Při metodě *in vivo in situ* je malý objem léčiva (50-100 μL) podán přímo do nosní dutiny. Ve vhodném časovém intervalu je nosní dutina promývána Ringerovým roztokem pomocí pumpy a pomocí jednoduchých analytických metod jsou zjišťovány koncentrace léčiva.¹⁰

U metody *in vivo* je léčivá látka dávkována přímo do nosní dutiny a opakovaně jsou odebírány vzorky krve a analyzovány. Data získaná touto metodou jsou opakovatelná a velmi spolehlivá. Tato metoda může být použita i na větších zvířatech, jako jsou psi, ovce a opice. Léčivo je podáváno zvířeti v narkóze a důležité je snížit ztráty léčiva způsobené jeho vytečením do hltanu.¹⁰

Zatímco *in vivo* studie reprezentují nejdůležitější test pro nosní léčivé látky a přípravky, k objasnění mechanismů absorpce je lepší využít dobře definované a kontrolované studie *in vitro*. *In vitro* modely buněčných struktur nabízejí mnoho výhod, např. kontrolované prostředí pro studium růstu a diferenciaci epitheliálních buněk, objasnění transportních drah a mechanismu, rychlé a vhodné prostředky pro odhad prostupnosti léčiv a příležitost snížit drahé a kontroverzní používání zvířecích modelů.⁹

Jiným způsobem provádění metody *in vitro* je studium nosní absorpce na vyříznuté nosní sliznici. Protože je velmi obtížné získat lidskou tkáň z nosních biopsií, provádí se většina těchto studií na tkáních různých zvířecích druhů.¹¹

U modelu králíka je roztok léčiva vstříknut do nozder při držení hlavy králíka ve svislé poloze a králík může normálně dýchat. Vzorky krve se odebírají z ušní žíly. Jednou z výhod králíčího modelu je, že objem krve je dostatečný pro opakované odebírání a farmakokinetickou analýzu.¹²

In vivo je nosní absorpce studována na různých druzích savců, zahrnujících potkana, králíka, psa, ovci a opice. Psi, ovce a opice mohou být udržovány při vědomí během podávání léčiv, aby tak nejlépe napodobovali podmínky při podávání léčiv u člověka.¹²

Vzhledem k velkým mezidruhovým rozdílům mezi potkany, králíky a dalšími zvířecími druhy a člověkem je nutné vybírat zvířecí modely pro studium nosní absorpce opatrně.

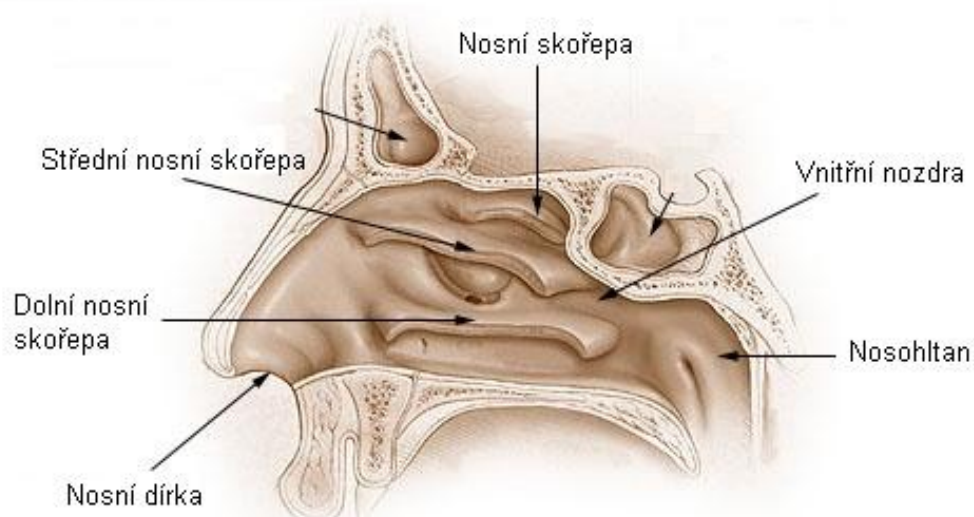
Tabulka č.2 Faktory ovlivňující nosní absorpci léčiv¹³

Biologické faktory	Vlastnosti přípravku
1.strukturní vlastnosti	1.fyzikálně-chemické vlastnosti léčivé látky
2.biochemické vlastnosti	- molekulová hmotnost
3.fyziologické vlastnosti	-rozpustnost
-cévní zásobení a inervace	-lipofilita
-nosní sekrece	-disociační konstanta a rozdělovací koeficient
-nosní cyklus	2.fyzikálně-chemické vlastnosti přípravku
-pH v nosní dutině	-pH a dráždivost sliznice
-mukociliární transport	-osmolarita
4.patologické podmínky	-viskozita a hustota
5.faktory prostředí	-distribuce léčivé látky
-teplota	-množství aplikovaného přípravku
-vlhkost	-typ lékové formy
	3.faktory spojené s aplikačním zařízením
	-velikost částic kapaliny/prášku
	-místo a vzor uložení

6 Anatomie a fyziologie nosu

6.1 Stavba nosní dutiny

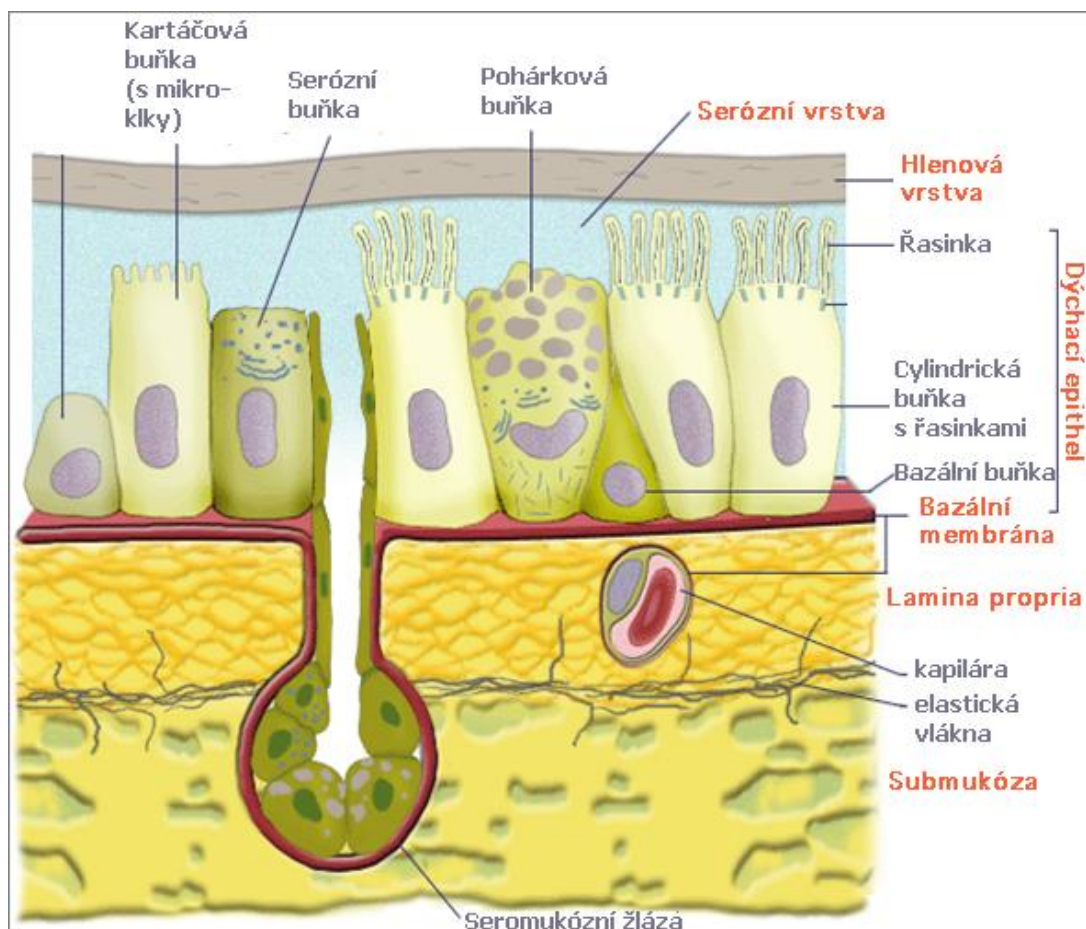
Nos je strukturně i funkčně komplexní orgán horních cest dýchacích. Je to první místo vstupu vdechovaného vzduchu v dýchacím traktu u savců a plní mnoho důležitých, ale zároveň odlišných funkcí. Nos slouží nejen jako primární orgán čichu, ale funguje také jako účinný filtr a zvlhčuje a ohřívá vdechovaný vzduch před vstupem do vzdálenějších částí dýchací soustavy.¹⁴



Obr.č.2 Nos a nosní dutiny¹⁵

Nosní dutina je rozdělená na dvě poloviny nosní přepážkou a od nosního otvoru po nosohltan měří asi 12 cm.¹² Celková plocha obou polovin je asi 150 cm² a objem kolem 15 ml.^{3,16} Každou polovinu nosní dutiny je možné rozdělit na několik strukturně odlišných regionů: vestibulum s plochou asi 0,6 cm², čichový region, který tvoří asi 10% celkové plochy nosní dutiny a dýchací region zaujímající 85% celkové plochy, což činí asi 130 cm².⁹

Sliznici pokrývající horní cesty dýchací lze rozdělit na 2 vrstvy: luminální povrchový epitel a pod ním ležící pojivovou tkáň neboli lamina propria.¹⁴



Obr.č.3 Průřez nosní sliznicí¹⁷

Vestibulum

Vestibulum je nejřednější částí nosní dutiny a ústí v obličeji ve dvě nosní dírký. V předsiní je mnohovrstevný dlaždicový epitel, nad nosními dírkami nejprve v uspořádání typickém pro kůži, s rohověním a s chlupy, který postupně přechází v mnohovrstevný dlaždicový epitel bez rohovění.¹⁸ Po obvodu předsině vyrůstají v dospělosti tuhé chlupy, které se uprostřed předsině kříží a zabráňují vnikání větších částic prachu do nosní dutiny. Díky svojí stavbě je předsině velmi odolná před vysoušením, proti škodlivým látkám z prostředí a omezuje vstřebávání látek.¹⁸

Dýchací oddíl

Dýchací oddíl zabírá největší část nosní dutiny a zde dochází k největší absorpci léčivých látek.⁶ Tato část je rozdělena třemi nosními výběžky-skořepami na nosní průchody, které pokrývá víceřadý řasinkový epitel, typický spíše pro dýchací cesty. Ve více namáhaných částech dýchacího oddílu se nachází i víceřadý epitel bez řasinek. Oba dva druhy buněk tvoří na apikální straně mikrokylky, které zvětšují celkovou plochu nosní sliznice.¹⁹

Řasinky jsou vláskovité útvary na povrchu epitheliálních buněk. Jedna buňka má na apikální straně průměrně 200 řasinek, každá je dlouhá 5-10 μm a 0,1-0,3 μm široká a pohybují se s průměrnou frekvencí 15-20 Hz.²⁰

Pohyb řasinek se dá rozdělit do tří fází: účinný úder, při kterém je řasinka maximálně napnutá, odpočinková fáze, ve které je řasinka vodorovně s buněčným povrchem, a příprava na další pohyb.⁹ Optimální teplota pro pohyb řasinek je 18-37°C, pohyb řasinek ustává při 7-12°C.²¹ Pohárkové buňky roztroušené v epitelu dýchacího regionu produkují na jeho povrchu malé množství viskózního hlenu. Mezi submukózní žlázy, které produkují velké množství nosního hlenu, patří seromukózní buňky, které uvolňují hlenový gel a serózní buňky, které uvolňují kapalinu.¹⁹

Čichový oddíl

Čichový oddíl se nachází mezi horní a střední skořepou nosní. Epitel obsahuje nízké bazální buňky kuželovitého tvaru s výběžky větvcími se mezi ostatní buňky, podpůrné buňky cylindrické s užšími bázemi a s mikrokylky na volném povrchu, obsahujícími červenohnědý pigment, a čichové buňky rozptýlené mezi podpůrnými bazálními buňkami. Čichové buňky jsou vlastně bipolární neurony, na volném povrchu mají po 6 až 8 cíliích, jež představují receptorovou část buňky, citlivou na chemické podněty z látek rozptýlených ve vzduchu; z bazální strany buněk vychází nervové vlákno, které prochází přes lamina cribrosa a vstupuje do čichového bulbu předního mozku.¹⁸ O využití čichové oblasti se diskutuje při vývoji léčivých látek, které by mohly být podávány touto cestou přímo do mozku.²

Epitheliální buňky jsou ve sliznici mezi sebou v úzkém kontaktu a sousedící buňky k sobě extrémně lpí. Přilnavost mezi vrcholky epitheliálních buněk lze pozorovat ve speciální oblasti souhrnně nazývané jako junkční zóna. Těsná spojení umožňují kontrolovat přechod iontů a molekul mezi buňkami a tvoří bariéru pro pohyb makromolekul do mezibuněčných prostorů.²²

Bazální membrána a lamina propria

Pod sliznicí se nachází bazální membrána tvořená kolagenovými vlákny. K bazální membráně se připojují všechny buňky nosní sliznice a odděluje epitel od lamina propria ležící pod ním.

Lamina propria mucosae je volnější typ pojivové tkáně, který obsahuje žlázy, subepitheliální buňky, cévní a nervovou tkáň. Ve vrchní části je tvořena vazivem řídkým, v hlubších vrstvách hustým kolagenním vazivem, které plynule přechází do periostu kostěného podkladu. Obsahuje četné rozvětvené tubulózní žlázy serózního a seromukózního typu.¹⁸

6.2 Cévní zásobení nosní dutiny

Tepny pro nosní dutinu přicházejí z a. ophtalmica cestou a. ethmoidalis anterior et posterior pro přední a střední část nosní dutiny, kde tyto tepny vysílají větve ke sliznici septa i ostatních stěn, a z a. maxillaris cestou a. sphenopalatina, která vysílá ke sliznici zadní části dutiny nosní arteriae nasales posteriores, laterales et septi.¹⁸

Žíly nosní dutiny vytvářejí bohaté pleteně ve skořepách, nejbohatší na dolní skořepě nosní – plexus cavernosi concharum – a sbírají se jednak dozadu, podél aa. nasales posteriores do plexus pterygoideus přes) fossa pterygopalatina a do žil měkkého patra a jimi do plexus pharyngeus, jednak dopředu, a to do žil obličeje přes zevní nos, a kraniálně do žil orbity cestou venae ethmoidales, anterior et posterior.¹⁸

6.3 Inervace nosní dutiny

Sliznice dutiny nosní je senzitivně inervována v přední části z 1. větve n. trigeminus cestou n. ethmoidalis anterior et posterior (n. ethmoidalis anterior vysílá rami nasales

interní pro oblast před konchami a pro střední část septa, rami nasales laterales pro střední část laterální stěny, rami nasales mediales pro přední část septa, a ramus nasalis externus, který žlábkem na spodní ploše os nasale projde na hřbet nosní a inervuje kůži hrotu a křídla nosního). V zadní části inervují senzitivně sliznici nervy z 2. větve n. trigeminus, a to rami nasales posteriores (superiores mediales k zadní části boční stěny, k horní a střední skořepě a n. nasopalatinus jdoucí podél septa do canalis incisivus a tudy na tvrdé patro). Se senzitivními nervy sliznice přicházejí i vlákna autonomní, která se k nim přidávají z ganglion pterygopalatinum a z autonomní pleteně provázející a. ophtalmica a její větve.¹⁸

6.4 Fyziologie nosní dutiny

6.4.1 Nosní hlen

Nosní hlen je směsí výměšků z pohárkových buněk, tekutiny přestoupivší z tkání a vody kondenzované z vydechovaného vzduchu.²² Hlavní složkou je voda, tvoří 95% celkového objemu. Další 2% tvoří glykoprotein mucin, který je produkován pohárkovými buňkami ve formě kondenzovaných granulí pomocí exocytózy.^{3,19} Mucin je heterogenní makromolekula složená z proteinového jádra s oligosacharidovými bočními řetězci, zesíťovanými navzájem pomocí disulfidických a vodíkových vazeb. V prostoru vytváří rozvětvenou trojrozměrnou síť s velkým počtem ok.²³ 1% tvoří další proteiny zahrnující albumin, imunoglobuliny, lysozym a laktoferrin. Další procento tvoří anorganické soli a méně než jedno procento zaujímají lipidy. Nosní hlen obsahuje ještě IgA, IgE a IgG.⁶

Po uvolnění z buňky podléhají granule masivnímu bobtnání a v mucinu dochází k zesíťování vazeb za tvorby viskoelastického gelu.¹⁹ Hlen jako celek vykazuje newtonovské chování, to znamená, že má vlastnosti jak kapaliny, tak pevné látky. Viskózní vlastnosti umožňují účinné přijetí energie přenesené na hlen z řasinek a elastické vlastnosti umožňují jeho dostatečnou soudržnost při pohybu.²⁰

Denně je produkováno 1,5-2 l hlenu.³ Na povrchu nosní sliznice tvoří hlen dvě vrstvy. Spodní koloidní vrstva je tvořena kapalinou o malé viskozitě, která obklopuje řasinky. Vrchní gelová vrstva pokrývá vrcholky řasinek a je jimi posunována

směrem k nosohltanu. Obě vrstvy jsou dohromady silné asi 5 μm . Tloušťka a složení dvojvrstvy jsou důležité pro mukociliární transport. Když je koloidní vrstva příliš úzká, tak je pohyb řasinek inhibován viskózní gelovou vrstvou. Když je koloidní vrstva příliš silná, tak gelová vrstva ztrácí kontakt s řasinkami a je narušen transport hlenu.¹⁹

Změny ve struktuře hlenu mohou vést ke změnám v prostupnosti léčiv přes hlenovou vrstvu. To je velmi důležité zvláště u proteinů a peptidů, které mohou uprostřed matricové sítě narazit na odpor. Je důležité porozumět interakcím mezi léčivou látkou a hlenem, protože tyto interakce mohou ovlivňovat absorpci léčivých látek a tím jejich aktivitu.³

6.4.2 Nosní enzymy

Nosní sliznice obsahuje velké množství enzymů, které jsou přítomny v nosním hleně, v cytosolu buněk, kde mohou být volné nebo vázané v membráně, a v lamina propria, kde jsou částečně spojené s tkání přítomných žlázek. Většina literatury se zabývá studii nosních enzymů na zvířatech, ale bylo zjištěno, že přes mezidruhovému rozdílu je složení enzymů metabolizujících léčivé látky u lidí podobné.²²

V nosní sliznici byly identifikovány enzymy z rodiny monooxygenáz, reduktáz, transferáz, esteráz a proteolytických enzymů. Monooxygenázy, jako např. cytochrom P-450 dependentní monooxygenáza, hrají zřejmě důležitou roli v první linii obrany organismu proti inhalovaným škodlivým látkám, zejména látkám znečišťujícím životní prostředí a těkavým a páchnoucím chemikáliím, které jsou tak přeměňovány na nejedovaté sloučeniny a mohou být vyloučeny z organismu.²² Mezi léčivé látky, které jsou metabolizovány cytochrom P-450 dependentní monooxygenázou, patří např. nosní dekongestans, anestetika, alkoholy, nikotin a kokain.⁴⁶

Vedle monooxygenázového systému P-450 zde nalezneme i některé oxidativní enzymy fáze 1 a konjugativní enzymy fáze 2. Enzymy fáze 1 zahrnují flavinmonooxygenázy a aldehyddehydrogenázy, epoxidové hydrolázy, karboxylesterázy a karbonátanhydrázy. Z enzymů konjugativní fáze 2 nalezneme v nosní sliznici glukuronyl- a sulfáttransferázu a glutathiontransferázu. Zmíněné enzymy 1 a 2 fáze byly studovány pouze z toxikologického hlediska, protože

produkují jedovaté metabolity ze škodlivých sloučenin přijímaných z prostředí ve vdechovaném vzduchu.²

Mezi další enzymy přítomné v nosní dutině a ve sliznici patří exopeptidázy, jako mono- a diaminopeptidázy, a endopeptidázy, jako serin, cystein a aspartát proteinázy ze třídy hydroláz. Tyto enzymy jsou schopné rozštěpit peptidy a proteiny na jejich N a C koncích a potažmo uprostřed peptidové vazby.²⁷

6.4.3 Efluxní systém

Apikální oblast obrvených epitheliálních buněk a cévy v lamina propria dýchacího oddílu obsahují P-glykoprotein, což je efluxní transportér, který hraje důležitou roli v ochraně organismu před vstupem cizích látek.²⁴ P-glykoprotein je velký, glykosylovaný membránový protein nacházející se v různých tkáních v lidském těle. U lidí se vyskytují dvě formy tohoto proteinu. Funkcí tohoto proteinu je aktivní pumpování léčivých látek a jiných sloučenin z buněk zpět do lumenálního prostoru. Vliv efluxního systému na intranasální absorpci léčiv je předmětem dalšího zkoumání.²⁹

6.4.4 Vliv cévního zásobení na intranasální absorpci

Lamina propria je bohatá na cévní zásobení. To se liší ve třech bodech od zásobení tracheobronchiálního kmene. Za prvé jsou v nose přítomny venózní sinusoidy, za druhé jsou přítomny arterio-venózní anastomózy a za třetí vykazuje nosní zásobení cyklické změny v množství protékající krve, které dávají vzniknout pravidelnému nosnímu cyklu.

Arterioly jsou zvláštní tím, že nemají vnitřní elastickou membránu, takže endoteliální bazální membrána je spojena s nosní bazální membránou pouze buňkami hladké cévní svaloviny. Výsledkem této charakteristické vlastnosti nosních arteriol je snadnější ovlivnění subendoteliální svaloviny různými látkami, jako jsou mediátory, hormony, a léčivé látky cirkulující v krevním oběhu.

Kapiláry pod povrchem sliznice a kolem žláz jsou fenestrovaného typu. Jsou vhodné pro rychlý pohyb tekutiny přes cévní stěnu. To dovoluje vodě vystupovat do lumen dýchacích cest a podílet se na zvlhčování vdechovaného vzduchu.

Venózní sinusoidy jsou velké, kavernózní cévy, umístěné především v nižších částech nosních skořep a jsou také typické pro nosní sliznici. Normálně je jejich hladká svalovina díky sympatické inervaci v napůl kontrahovaném stavu. Když se naplní krví, sliznice zduří a uzavře buď částečně (fyziologický stav) nebo úplně (v případě nemoci) lumen dýchacích cest.

Stěna postkapilárních žilek je zodpovědná za výstup plazmy z cév v přítomnosti zánětu na sliznici, a to díky otevření mezibuněčných spojení mezi endoteliálními buňkami. To vede ke zvýšení intersticiálního objemu a tlaku a později k vytlačení tekutiny podobné plazmě do lumen jako exsudátu. Extravazaci plazmy může způsobovat velké množství mediátorů včetně histaminu, bradykininu, různých prostaglandinů nebo substance P.

Arterio-venózní anastomózy hrají roli v kontrole teploty a množství vody. Podobné anastomózy můžeme najít v pokožce prstů rukou a nohou, nehtových lůžkách a rtech. Nejméně 50% krevního objemu je vedeno přes arterio-venózní anastomózy.¹⁹

Křivolaká síť cévních anastomóz je zvláště hustá v oblastech, kde proudí největší množství vdechovaného vzduchu, a díky kontrole rychlosti a objemu protékající krve v těchto cévách je možné udržovat optimální teplotu vdechovaného vzduchu. Překrvení venózní sítě může vést k otoku sliznice a ke zbytnění tkáně, což může dočasně uzavřít přístup vzduchu.²²

Krevní zásobení nosu je ovlivňováno některými vnějšími a fyziologickými faktory, jako jsou okolní teplota, vlhkost, přítomnost vasoaktivních léčivých látek, zranění a zánět, stejně jako psychologickými faktory, mezi které patří vzrušení, strach, úzkost a zklamání. Tok krve je také velmi citlivý na různé léčivé látky podávané lokálně i systémově. Látky jako klonidin a oxymetazolin snižují průtok krve, zatímco histamin, fenylefrin a fenoterol krevní průtok zvyšují.²

6.4.5 Nervová regulace

Krevní cévy mají jak sympatickou, tak parasympatickou inervaci, ale kontrolovány jsou hlavně vlákny sympatiku. Souvislé uvolňování noradrenalinu udržuje sinusoidy v částečně kontrahovaném stavu, vazokonstrikce vyvolaná stimulací α -adrenergních

receptorů je zřetelnější než vasodilatace vyvolaná stimulací β_2 -receptorů.¹⁹ Stimulace α -receptorů snižuje krevní průtok v nose u zvířat i u lidí.²

6.4.6 Nosní cyklus

Jako nosní cyklus je popisováno střídavé uzavírání nosních dutin pomocí překrvení a odkrvení nosních sinusoid. Šířka nosní dutiny je aktivně regulována sympatickou inervací a tonem venózních sinusoid.²⁵ Předpokládá se, že toto uzavírání se děje opakovaně a každé 2-4 hodiny se střídá pravá a levá strana nosní dutiny, aby se předešlo vyschnutí nosní sliznice. Nosní cyklus může mít vliv na rozsah vstřebávání léčivých látek.¹⁹

Nosní cyklus hraje roli v obraně dýchacího traktu tím, že a) rozděluje podíl na zvlhčování vzduchu mezi obě nosní dutiny, b) vytváří exudát plazmy, který fyzikálně čistí sliznici a poskytuje zdroj protilátek a mediátorů zánětu, c) udržuje průchodnost dýchacích cest během zánětlivé odpovědi na infekci.²⁶

Dřívější studie ukazovaly, že nosní cyklus je přítomen u přibližně 80% populace, ale nedávné práce naznačují, že pravidelné změny v regulaci průchodu vzduchu nosními dutinami se vyskytují pouze u 21%-39% populace.²⁶

6.4.7 Mukociliární transport

Mukociliární transport je důležitý nespecifický obranný mechanismus horních cest dýchacích, určený k ochraně organismu před vdechovanými škodlivými látkami jako jsou alergeny, bakterie, viry a toxiny.¹² Jedná se o kombinaci účinku hlenové vrstvy a pohybu řasinek. Částice, zachycené v hlenové vrstvě pokrývající nosní epithel, jsou transportovány vlněním řasinek směrem k nosohltanu a polykáním posunovány do žaludku.

Jednotlivé řasinky se vlní směrem nahoru a během efektivního úderu a vrcholek proniká do hlenové vrstvy. Řasinka přenáší svojí energii do pomalu se pohybující hlenové vrstvy a vrcholek pak pokračuje v pohybu dolů do periciliární tekutiny. Zatímco efektivní úder pohání nad ním ležící hlen dopředu, pod ním ležící tekutina se hýbe jen dopředu a zpět během celého cyklu. Metachronní koordinace řasinek udržuje neustálý tlak na hlen ve směru dopředu. Přítomnost několika metachronních

vln pod vrchní vrstvou hlenu šíří hnací pohyb, takže se vrchní vrstva hlenu pohybuje jako celek.²⁰ Mukociliární transport je účinný pouze tehdy, pohybují-li se řasinky koordinovaně s ostatními řasinkami na stejné buňce i na buňkách okolních a jsou-li orientovány stejným směrem. Frekvence pohybu řasinek je uváděna v rozmezí 10–20 Hz, hlen je posouván rychlostí 5 mm/min.²⁴

Účinnost nosního mukociliárního transportního systému závisí na třech složkách: a) rozsah činnosti řasinek, který je určen délkou a hustotou řasinek a frekvencí, s jakou se pohybují; b) množství hlenu a tloušťka periciliární vrstvy a c) viskoelastické vlastnosti hlenu. Změny v jakékoliv z těchto tří složek mohou způsobit poškození mukociliárního transportního systému.²⁰

Mukociliární transport je ovlivňován velkým množstvím faktorů, mezi něž patří patofyziologie nosu, teplota a vlhkost vdechovaného vzduchu, léky, škodlivé látky z ovzduší a pH nosního sekretu.²⁷ Předpokládá se, že nízká teplota a vlhkost přispívají ke snížení počtu obrvených buněk. Pochopitelně proto je hustota obrvených buněk v přední části nosní dutiny v důsledku proudění studeného, suchého a znečištěného vzduchu snížena.¹⁹

6.4.7.1 Metody měření mukociliárního transportu

Pro měření mukociliárního transportu, a tím určení času, po který zůstane léková forma v nosní dutině, se používá široká škála metod. Rychlost nosního mukociliárního transportu určují vlastnosti jako absolutní rychlost transportu, rychlost toku hlenu a mukociliární čas transportu (MTT). Absolutní transport podané dávky je monitorován gamma kamerou, která měří transport radiově značené lékové formy. Čas toku hlenu se měří jako transportní čas nebo rychlost pohybu markeru umístěného na nosní sliznici. Kontinuální monitorování nosního epitelu pomocí gamma kamery poskytuje informaci o transportním čase lékové formy.²⁷ Nosní MTT je možno měřit u zdravých dobrovolníků pomocí metody využívající sodnou sůl sacharinu, barvivo nebo obě látky najednou. Malé množství sledované látky se umístí asi 1 cm za hrot nosní spodní skořepy. Pak se měří čas, za jaký dobrovolník ucítí sladkou chuť nebo se ve faryngeální oblasti objeví barvivo.¹⁹ Bylo zjištěno, že

mukociliární čas transportu je u zdravého člověka od 2,5 do 25 minut.²⁷ Čas průchodu delší než 30 minut je považován za abnormální. Ve studii na zdravých dobrovolnících bylo zjištěno, že mukociliární transport je nezávislý na pohlaví a věku.²⁰

6.4.7.2 Vliv léčiv na nosní mukociliární transport

Systém mukociliárního transportu v dýchacích cestách může být ovlivněn velkým množstvím látek, a to jak stimulací nebo inhibicí. Pro nosní podávání léčiv je závažnější možný inhibiční efekt, protože ten může mít za následek nežádoucí vedlejší účinky na mukociliární transport.²⁰

α -adrenergní agonisté jako xylometazolin a oxymetazolin inhibují ciliární aktivitu in vitro u některých modelových druhů. Jiná léčiva užívaná k povrchové nosní aplikaci jsou kortikosteroidy a antihistaminika. Nosní sprej s betamethasonem ukazuje inhibiční efekt in vitro, ale in vivo nebyly u lidí pozorovány žádné nepříznivé účinky na mukociliární transport. Kortikosteroidní sprej neukázal žádné škodlivé účinky na řasinkový epitel u opic.²⁰

Mnoho proteinových a peptidických léčiv zkoumaných pro systémové podání nosní cestou bylo studováno s ohledem na jejich účinek na aktivitu řasinek. Insulin nezpůsobuje u potkanů in vitro cilioinhibici a vede pouze k slabému, reversibilnímu snížení mukociliárního transportu.²⁸ Lososí kalcitonin nemá žádný efekt na mukociliární transport na modelu žabích pater ani na frekvenci ciliárního vlnění na modelu myších sept. Navíc insulin ani lososí kalcitonin nesnižují frekvenci řasinkového vlnění na modelu trachey kuřecích embryí.²⁰

6.5 Patologické podmínky v nose

6.5.1 Chronická onemocnění

Existuje velké množství patologických stavů, při kterých mukociliární transport nefunguje správně. U pacientů s primární ciliární dyskinezi, kteří nemají žádné nebo nepohyblivé řasinky, se často vyskytují infekce dýchacího traktu. Pacienti s cystickou fibrózou mají ve srovnání se zdravými lidmi také poškozený

mukociliární transportní systém, ale jejich řasinky jsou normální a fungují správně. Hlen má u pacientů s cystickou fibrózou snížený obsah vody a rychlost transportu takového hlenu byla při pozorováních in vitro snížena.²⁰

Mnoho nemocí je spojeno s abnormálně tvarovanou nosní dutinou. Velký vliv nosní geometrie na způsob ukládání má za následek různou účinnost při podávání nosních přípravků.³²

U pacientů s diabetem, kteří jsou náchylní k nosním infekcím, bylo zjištěno významné prodloužení času nosního mukociliárního transportu ve srovnání s kontrolní skupinou nediabetiků.²⁰

6.5.2 Akutní onemocnění

V případě virových a bakteriálních infekcí je mukociliární transportní systém oslaben, zejména díky ztrátě řasinek, ale pravděpodobně také díky změnám v reologických vlastnostech hlenu. U pacientů s nachlazením byla pozorována ztráta řasinek během prvního týdne a k úplné obnově došlo během tří týdnů.²⁰ Většina akutních stavů se projevuje krvácením, nadměrnou tvorbou hlenu, ucpáním nosu a tvorbou strupů. Bylo zjištěno, že nadměrná tvorba hlenu může vymýt léčivo aplikované do nosu dříve, než může být absorbováno.

Některé studie přesto nasvědčují tomu, že patologické stavy neovlivňují absorpci nosem podávaných peptidových léčiv. Například studie absorpce buserelinu a desmopresinu ukázaly podobné absorpční profily u zdravých osob i u osob trpících nachlazením nebo rýmou.¹²

7 Faktory ovlivňující transnasální absorpci

7.1 Fyzikálně-chemické vlastnosti léčivé látky

7.1.1 Molekulová hmotnost

V nepřítomnosti látek zlepšujících průchod membránou byla zjištěna nepřímá úměra mezi mírou absorpce a molekulovou hmotností.²⁹ Ve velké srovnávací studii byla zkoumána nosní absorpce u 32 různých sloučenin o molekulové hmotnosti v rozmezí 160-34 000 Da. Procentuální míra absorpce vykazovala nepřímou úměru ve vztahu k molekulové hmotnosti a lišila se v rozmezí od 83% do 0,60% v pořadí od sloučenin s nejnižší molekulovou hmotností až po látky s nejvyšší molekulovou hmotností.²

Většina lipofilních léčiv podávaných intranasálně má nízkou molekulovou hmotnost (<1000 Da) a transport přes nosní membránu je relativně účinný ve srovnání s většími lipofilními léčivy. Pro polární léčiva, která jsou transportována paracelulárním cestou, je molekulová hmotnost velmi důležitým činitelem v míře a stupni transportu.²⁹ Biologická dostupnost u sloučenin s molekulovou hmotností nad 1000 Da není vyšší než 10%.³⁰

7.1.2 Rozpustnost

Rozpustnost léčiva ve vodném roztoku je důležitou sledovanou vlastností, protože nosní sliznice je nepřetržitě udržována vlhká nosním sekretem a velmi dobře prokrvená krevními vlásečnicemi. Nejenže ovlivňuje absorpci léčiva sama o sobě, ale může také snižovat schopnost vyrobit požadovaný produkt, pokud není léčivá látka dostatečně rozpustná v uvažovaném rozpouštědle. Z pohledu mechaniky a termodynamiky je důležité prostudovat vztah mezi mírou rozpustnosti léčivé látky a jeho absorpcí. Pro částicové nosní přípravky podávané buď ve formě inhalovaného prášku nebo suspenze se stává míra rozpustnosti velmi důležitou.²

Je obvyklé, že se přípravky používané intranasálně podávají na nosní sliznici ve formě molekulární disperze např. v roztoku. Objem přijatelný pro podání do nosní dutiny je poměrně malý, takže problém mohou představovat léčiva s nízkou

rozpuštěností ve vodě nebo vyžadující podání ve vysoké dávce. Pokud jsou léčiva podávána ve formě prášku, předchází proces rozpouštění procesu vstřebávání. Takový postup byl popsán např. pro systém tvořený chitosanovým práškem s obsaženým insulinem. V těchto případech se léčivo rozpouští v tekutině přítomné v nosní dutině.²⁹

V poslední době se objevují nové metody intranasálního podání založené na částicových systémech, jako jsou nanočástice, které nevyžadují rozpouštění. Předpokládá se, že nanočástice (a snad i mikročástice) mohou být transportovány do krevního oběhu bez předchozího rozpouštění. Na modelových částicích polystyrenu o velikosti 20-1000 nm bylo zjištěno, že přenos je závislý na velikosti (čím menší částice, tím vyšší přenos) stejně jako na povrchových vlastnostech částic.²⁹

7.1.3 Lipofilita/hydrofilita

Míra a rozsah absorpce léčiva procházejícího přes biologickou membránu jsou ovlivněny jeho hydrofilně-lipofilní rovnováhou. Na potkanech bylo provedeno velké množství studií k vyhodnocení vlivu lipofility na nosní absorpci. Bylo zjištěno, že nosní absorpce léčiva se zvyšuje s jeho rostoucí lipofilitou.²⁷ Dále autoři dospěli k závěru, že nosní absorpce byla vyšší u nízkomolekulárních látek se střední lipofilitou než u látek s vysokou molekulovou hmotností a vysokou lipofilitou. Lipofilní vlastnosti léčiva evidentně určují, jaký způsob transportu bude použit.²⁷

Lipofilní léčiva po nosním podání obecně vykazují rychlou a dostatečnou absorpci. Pro některá léčiva lze dosáhnout farmakokinetický profil shodný s intravenózním podáním. Nosní absorpce hydrofilních léčiv je na druhou stranu velice nízká. Biologická dostupnost se pohybuje pod 10% pro léčiva s nízkou molekulovou hmotností a méně než 1% pro peptidy. Mezi hlavní důvody velmi nízké biologické dostupnosti polárních sloučenin můžeme zařadit špatnou prostupnost biologickou membránou, rychlý transport léčiva a enzymatický rozklad v nosní dutině.⁹

7.1.4 Disociační a rozdělovací koeficient

Rozdělovací teorie vysvětluje postup absorpce léčiva přes biologickou membránu a jeho rozptýlení po obou stranách membrány. Většina léčiv se dobře absorbuje ve

své neionizované formě. Množství léčiva, které existuje v nosní dutině v neionizované formě je funkcí pKa molekuly léčiva a pH nosního sekretu. Protože převážná část sloučenin dostupných pro léčebné využití jsou původem slabé kyseliny nebo zásady, jejich stupeň ionizace závisí jen na pH nosního sekretu.²⁷

7.2 Fyzikálně-chemické vlastnosti přípravku

7.2.1 pH a dráždivost přípravku

U dospělých je pH nosního sekretu 5,5 - 6,5 a u dětí 5,0 – 6,7 a pH nosního povrchu je 7,39 u obou skupin. Hodnota pH je důležitou součástí fyzikálních obranných mechanismů proti mikrobiálním organismům. V různých tělních tekutinách včetně nosního sekretu se nachází lysozym, který je schopný rozpouštět některé bakterie, pokud je pH kyselé. Při alkalickém pH je lysozym inaktivován a nosní tkáň se stává náchylnou k mikrobiální infekci, a tak může být ovlivněn mukociliární transport a biologická dostupnost přípravku.²

Abychom se vyhnuli podráždění nosu, měly by mít podávané léčivé přípravky pH v rozmezí 4,5 – 6,5. Patogenní bakterie mohou být udržovány pod kontrolou udržováním pH přípravku v mírně kyselém rozmezí. Je důležité podávat nosní přípravky s vhodným pH, abychom se vyhnuli podráždění nosní sliznice a zároveň zabránili růstu patogenních bakterií v horních cestách dýchacích.²

7.2.2 Osmolarita

Vliv osmolarity přípravku na nosní absorpci byl zkoumán například při použití sekretinu jako modelového léčiva u potkanů. Výsledek ukázal silný vliv osmolarity na nosní absorpci. Nosní absorpce léčiva byla ovlivněna koncentrací chloridu sodného v přípravku. Maximální absorpce byla pozorována při 0,462 M koncentraci. Vyšší koncentrace chloridu sodného nejenže nevedla ke zvýšení biologické dostupnosti, ale působila dokonce toxicky na epitheliální buňky nosní sliznice. Zachování isotonicity přípravku snižuje poškození epitheliálních buněk a tím snižuje toxicitu nosního přípravku. Vliv tonicity přípravku na nosní absorpci a biologickou

dostupnost zatím nebyl intenzivněji studován. Je požadováno více studií, aby bylo optimalizováno použití modifikátorů tonicity v nosních přípravcích.²⁷

7.2.3 Viskozita a hustota

Přípravky s vyšší viskozitou zůstávají delší čas v kontaktu se sliznicí, což zvyšuje absorpci. Zároveň vysoká viskozita usnadňuje prostupnost léčivé látky.²⁴

Přesto studie provedená na desmopresinu ukázala, že přidání viskózního činidla do intranazálního přípravku sice může učinit účinek trvalejší, ale zároveň tak oddaluje nástup účinku a není dosaženo úplné biologické dostupnosti.²

7.2.4 Fyzikální a chemická stabilita

Mnoho léčivých látek je náchylných k některé z forem chemické nebo fyzikální nestability, např. k degradaci pomocí hydrolýzy nebo oxidace, izomerizace, fotochemického rozkladu nebo polymerace. Tyto procesy mohou vést ke ztrátě účinnosti léčiva nebo změnám ve fyzikálním vzhledu přípravku, třeba změně barvy. Všeobecně jsou peptidy a proteinová léčiva více náchylná než nízkomolekulární farmaceutika. Racionální strategie při tvorbě nových léčivých přípravků by měla vést k předcházení nebo omezení těchto škodlivých procesů během uchovávání léčiv.²⁹

7.2.5 Velikost částic

Jelikož má velikost podávaných nebo inhalovaných částic významný vliv na distribuci přípravku v nosní dutině, je důležité pro navržení a hodnocení aplikačních pomůcek tuto vlastnost dobře charakterizovat. Rozdělení velikosti částic aktivní složky nebo celého přípravku může být určeno před plněním do obalu, nebo až po uvedení celého přípravku do chodu. Výsledek druhého postupu je ovlivněn zařízením a jeho deagregačními vlastnostmi.³²

Téměř všechny částice o průměru větším než 10 μm jsou zachyceny v nosní dutině, zatímco většina částic menších než 1 μm prochází nosní dutinou do dalších částí dýchacího systému.³¹

7.2.6 Lokalizace přípravku v nosní dutině

Místo uložení nosního přípravku v nosní dutině je důležitým faktorem ovlivňujícím absorpci a biologickou dostupnost nosních lékových forem.

Při rozptýlu léčivé látky v nosní dutině jsou brány v úvahu dvě odlišná místa uložení: primární místo uložení ihned po aplikaci a sekundární konečné místo uložení jako výsledek rozptýlu pomocí mukociliárního transportu. Zatímco primární místo uložení určuje míru mukociliárního transportu, sekundární místo uložení ovlivňuje míru absorpce na léčivou látkou pokrytém povrchu sliznice.³²

Umístění přípravku v přední části nosu poskytuje prodloužení doby, po kterou zůstává léčivo v nosní dutině, a umožňuje tím lepší absorpci. Přípravek umístěný v zadní části nosní dutiny je odstraňován pomocí mukociliárního transportu a je tak snížena jeho biologická dostupnost.²⁷

Nosní kapky, tradičně užívaný přípravek, jsou spojeny s krátkým rezidenčním časem v nosní dutině. Nosní spreje ukládají léčivou látku více vpředu než nosní kapky, což má za následek pomalejší transport sprejů než kapek. Vztah mezi umístěním tekuté lékové formy a biologickou dostupností a/nebo terapeutickým účinkem není snadné zjistit. Všechny tyto vlastnosti ovlivňuje velké množství faktorů jako poloha hlavy, viskozita, dávkovací zařízení, isotonicita a objem použité lékové formy.²⁷

Místo depozice tekutých lékových forem aplikovaných ve formě spreje závisí na dávkovacím zařízení, způsobu podání a fyzikálně-chemických vlastnostech molekuly léčiva. Na depozici se z fyzikálního hlediska podílejí tři depoziční mechanismy, kterými jsou setrvačné zaklínění (inertial impaction), gravitační sedimentace a Brownova difuze. Setrvačné zaklínění se projevuje vždy, když proud vzduchu, který nese částice, změní směr. Pokud jsou částice těžké, velké nebo se pohybují rychle, nejsou schopny sledovat proud vzduchu, pokud změní svůj směr. Místo toho vyletí z dráhy a dopadnou na nosní stěnu. Gravitační sedimentace může ovlivnit depozici pouze v případě, že se od sebe částice liší velikostí, protože hustota je dána charakterem léčivé látky. Brownův pohyb je omezen na částice o průměru menším než 0,5 μm . Tento mechanismus můžeme zanedbat, protože částice v intranasálních lékových formách mají zřídka velikost 0,5 μm a menší.³²

Práškové formy se mimo klinický výzkum používají mnohem méně. Jejich residenční čas je srovnatelný s tekutými lékovými formami. Dalšího prodloužení residenčního času lze dosáhnout použitím bioadhezivních polymerů. Aerodynamické vlastnosti práškových forem určují vzor ukládání v nose. Mimo to mají vlastnosti prášků, jako velikost částic a jejich tvar, hustota a tokové vlastnosti a vlastnosti dávkovacího zařízení, vliv na distribuci léčiva v nose, čímž ovlivňují absorpci a biologickou dostupnost.²⁷

Uložení gelu v nosní dutině záleží na způsobu podání, protože nosní gel má pouze omezenou schopnost rozprostřít se kvůli své vysoké viskozitě a tím vykazuje úzkou distribuční plochu v nosní dutině.²⁷

Mnoho studií se zabývá vlivem mukociliárního transportu na polohu sekundárního místa uložení. Po podání léčiva do nosní dutiny rozlišujeme 3 různé fáze transportu. První fáze se děje během první minuty po podání. Převážně platí pro tekuté přípravky a pro velké podávané objemy a jedná se o velmi rychlé odstranění polykáním nebo protečením přípravku do hltanu. Následuje druhá fáze trvající asi 15-30 minut po aplikaci, která je výsledkem postupného odstraňování částic uložených na obrveném povrchu v hlavním nosním průchodu. Část podané dávky, která je uložena v neobrvené přední části nosu, mizí velmi pomalu. Tato třetí část odstraňování trvá několik hodin. V závislosti na úvodním rozdělení přípravku mezi přední neobrvenou a zadní obrvenou oblastí můžeme rozlišit míru očištění a zadržené množství.³²

7.2.7 Aplikované množství přípravku

Vliv velikosti dávky na nosní absorpci byl studován na velkém množství sloučenin jako sekretin, kalcitonin, desmopresin atd. Vyšší nosní absorpce byla pozorována u vysokých dávek.² Nosní dutina má však schopnost zadržet pouze omezené množství z celkově podaného objemu a množství, které je navíc, odečte z nosní dutiny a tím je snížena dostupnost léčivé látky. Optimální množství přípravku by se mělo pohybovat v rozmezí 25 μ l – 200 μ l na každou nosní díрку.² Některé studie uvádějí, že při objemu 100 μ l je dosaženo největší ukládací plochy.³²

8 Lékové formy pro nosní aplikaci

Výběr nejvhodnější lékové formy a dávkovacího systému závisí na fyzikálně-chemických vlastnostech léčiva, místě jeho zamýšleného působení, terapeutickém cíli, na compliance pacienta a na očekávané pozici léku na trhu.

8.1 Tekuté lékové formy

Tekuté přípravky jsou nejrozšířenější užívané dávkovací formy pro nosní podání. Řadíme mezi ně roztoky a suspenze.

Roztoky jsou vhodné v případě, že je účinná látka rozpustná ve vodě nebo v jiném vhodném vehikulu. V současnosti jsou nosní roztoky dostupné ve formě kapek a sprejů. Nosní kapky jsou zřejmě nejjednodušší a nejvhodnější lékovou formou pro podání do nosní dutiny.¹²

Velkou nevýhodou lékových forem založených na vodní bázi je jejich mikrobiální stabilita, protože vyžadují konzervační látky, které mohou zhoršovat mukociliární transport. Zvláště při dlouhodobé léčbě mohou konzervační prostředky být hlavním původcem podráždění a alergické rýmy. Mezi další nevýhody tekutých přípravků patří vedle mikrobiologické nestability i snížená chemická stabilita rozpuštěných léčivých látek a krátká doba, po kterou zůstává přípravek v nosní dutině. Místo uložení a způsob uložení přípravků aplikovaných nosem je závislé na dávkovacím zařízení, způsobu podání a fyzikálně-chemických vlastnostech přípravku.³²

Suspenze lze také využít k podávání léčivých látek do nosní dutiny. Vzhledem k množství specifických požadavků na uchovávání těchto látek s ohledem na zachování dané velikosti a vlastnostech částic se však používají mnohem méně než roztoky. Suspenze nabízejí možnost zlepšení dostupnosti tím, že prodlužují čas, po který přípravek zůstává v nosní dutině.¹²

8.2 Práškové formy

Práškové formy jsou připravovány v případě, že není k dispozici vhodná suspenze nebo roztok. Z pochopitelných důvodů nejsou práškové formy příliš oblíbené. Mohou způsobovat podráždění nosní sliznice a pocit krupice v nose.² Na druhou

stranu je výhodou, že se při výrobě nepoužívají konzervační látky a suché prášky se také vyznačují zlepšenou stabilitou ve srovnání s roztoky nebo suspenzemi.³²

Ve srovnání s roztoky se prášky dále vyznačují delším kontaktem s nosní sliznicí, transportní čas prodlužuje i přidavek bioadhezivních látek. Práškové přípravky umožňují podání větší dávky léčivé látky bez nutnosti použít vehikulum. Mohou zvyšovat compliance zejména u dětí, a to v případě, že je jinak chuť a vůně léčivé látky nepřijatelná. Pro podávání do nosní dutiny se užívají speciální dávkovací systémy. Výroba této lékové formy je poměrně náročná a drahá.³²

8.3 Polotuhé lékové formy

Mezi nosní polotuhé lékové formy podle ČL 2009 patří emulze, masti a gely. Pouze omezené množství prací se zabývá výzkumem emulzí a mastí pro nosní podání. Díky jejich vlastnostem se zdají být vhodnější pro lokálně působící léčivé látky, i když se nedá vyloučit ani použití pro systémová léčiva. Mezi hlavní nevýhody nosních emulzí a mastí patří nižší akceptace u pacientů, vysoké nároky na vývoj lékové formy a problémy s přesným dávkováním.²

Gely jsou zahuštěné nebo gelatinizované roztoky nebo suspenze léčivých látek. Mezi výhody gelů patří redukce následného stečení léčivého přípravku do hrdla a tudíž minimalizace problémů způsobených nepříjemnou chutí a snížení ztrát léčiva z nosní dutiny do nosohltanu. Gely snižují zároveň i možnost vytečení přípravku nosními dírkami a umožňují lepší umístění léčivého přípravku na nosní sliznici a zlepšují tak nosní absorpci. U léčiv, která jsou dráždivá nebo se při jejich zapracování do lékové formy užívají dráždivé pomocné látky, mohou gely snižovat tento dráždivý účinek, protože umožňují použití látek snižujících tuto dráždivost, ale nejsou vhodné pro roztoky a další užívané lékové formy.² Umístění gelu v dutině nosní závisí na způsobu podání, protože kvůli svojí viskozitě má daná léková forma pouze malou schopnost rozprostřít se. Gely jsou vhodné jak pro lokální, tak pro systémový účinek.³²

8.4 Pomocné látky v nosních přípravcích

Pomocné látky jsou do přípravků přidávány z různých důvodů.

8.4.1 Rozpouštědla

Rozpustnost látek ve vodě zůstává hlavní překážkou při intranasálním podávání léčiv. Někdy je nutné použít v nosních přípravcích rozpouštědla nebo kosolventy. Mezi běžně užívané kosolventy můžeme zahrnout glykoly, malé množství ethanolu, Transcutol (diethylenglykolmonoethyléter), glyceridy se středně dlouhým řetězcem a Labrosol (nasycené polyglykolizované glyceridy s 8-10 uhlíky). V některých případech se k rozpouštění nerozpustných léčiv používají tenzidy.

Vhodnost daného řešení je nutné posoudit u každého přípravku zvlášť. Pokud je některé léčivo obzvlášť špatně rozpustné, je dobré využít více než jednu možnost. Pokud není možné zlepšit rozpustnost daného léčiva, je na místě vybrat přípravek bezvodý, přestože je použití vodných roztoků vhodnější.²

8.4.2 Pufry

Pro pufrování nosních přípravků se dá využít různé běžně dostupné pufry. Důležitým faktorem při jejich výběru je pufrací kapacita samotného přípravku. Zároveň je nutné brát ohled na to, že nosní přípravky jsou podávány v malém množství v rozmezí 20 - 200 µl. Je nutné pamatovat také na to, že nosní sekrece může ovlivnit pH přípravku.²

8.4.3 Antioxidanty

V závislosti na stabilitním profilu léčivé látky použité v přípravku může být nutné použít antioxidanty, abychom zabránili degradaci léčiva. Běžně se užívají metabisulfid sodný, bisulfid sodný a tokoferol. Obvykle jsou antioxidanty používány v malém množství, takže nemohou ovlivnit vstřebávání léčiva nebo způsobit nosní podráždění.²

8.4.4 Korigencia chuti

Některá léčiva mohou představovat problém s ohledem na jejich aroma a chuť. Chuť může být důležitá v případě, že podstatné množství přípravku steče do hrdla. V některých případech se tedy můžeme rozhodnout použít činidlo maskující chuť. Výběr takové látky bude záviset na druhu vyráběného léčivého přípravku.²

8.4.5 Protimikrobní konzervační látky

Nosní přípravky často obsahují protimikrobní látky kvůli ochraně před mikrobiální kontaminací. Běžně užívané konzervanty jsou parabeny, benzalkonium chlorid a benzoylalkohol. Konzervanty jsou užívány v malém množství, takže pravděpodobně neovlivňují vstřebávání léčiv.²

Tyto látky byly však intenzivně zkoumány s ohledem na jejich efekt na nosní mukociliární transport a frekvenci pohybu řasinek. Lipofilní konzervanty jako chlorbutanol a hydroxybenzoáty vykazovaly reverzibilní toxicitu k řasinkám jak v přítomnosti, tak při absenci hlenu. Methyl- a propylhydroxybenzoáty vykazovaly cilioinhibici in vitro při stejné nebo nižší koncentraci, než která se používá ve vodných roztocích léčiv.²⁰

V jedné studii bylo provedeno srovnání velkého množství volně prodejných nosních přípravků za měření frekvence pohybu řasinek in vitro na modelu embryonálních kuřecích průdušek. Bylo zjištěno, že konzervanty hrají rozhodující roli ve zjištěných ciliostatických účincích. Přípravky s nejsilnějším ciliostatickým efektem obsahovaly thiomersal a octan fenylrtuťnatý a byl pozorován větší ciliostatický účinek než u benzalkonium chloridu. Silný ciliostatický účinek ukázaly také menthol a eukalyptol, pomocné látky používané v některých nosních přípravcích.²⁰

Benzalkonium chlorid způsoboval cilioinhibici a ciliostázi in vitro na embryonálních kuřecích průduškách a morfologické změny u lidské adenoidní tkáň. In vivo u zvířat a lidí nebyly takové závažné účinky pozorovány. Tento rozdíl je způsobeným tím, že in vitro působí sloučeniny přímo na obrvenou tkáň, kdežto in vivo jsou řasinky chráněny vrstvou hlenu.³³

Po dlouhodobém podávání kortikosteroidního přípravku obsahujícího 0,01-0,02 % benzalkonium chloridu in vivo u potkanů a opic nebyly pozorovány žádné morfologické změny. U lidí nezpůsobil kortikosteroidní sprej s 0,02 % benzalkonium chloridu žádné podstatné změny v nosním mukociliárním transportu po akutním i dlouhodobém podání. Nebyly přítomny ani žádné změny ve frekvenci pohybu řasinek před a po podání léčby. Nosní podání 0,01 % benzalkonium chloridu u člověka bylo velmi dobře snášeno a nevedlo ke změnám v rychlosti nosního

transportu po jedné aplikaci. Dlouhodobé podání 0,02 % benzalkonium chloridu u lidí nevedlo ke změně rychlosti nosního mukociliárního transportu ani ke změnám ve stavbě nosní sliznice.²⁰

8.4.6 Humektanty/Zvlhčovačla

Abychom se vyhnuli podráždění nosu různými složkami přípravku, přidáváme k přípravku zvlhčovačla. Běžná zvlhčovačla zahrnují glycerol, sorbitol a mannitol. Všeobecně se předpokládá, že nemají vliv na vstřebávání léčiv.²

8.5 Typy dávkovacích systémů

Typ zařízení užívaného k podávání lékových forem hraje důležitou roli v zajištění účinnosti léčby.

8.5.1 Systémy pro tekuté přípravky

8.5.1.1 Jednodávkové obaly

Jednodávkové obaly nabízejí množství výhod. Ve srovnání s ostatními přípravky založenými na vodní bázi je hlavní výhodou absence konzervačních látek. Dále jsou tyto obaly lehké a vhodné k přenášení, což zvyšuje compliance pacientů. Jednodávková zařízení jsou přesnější než vícedávková rezervoárová zařízení, ale méně přesná než vícedávková zařízení s předem oddělenými dávkami.³²

V závislosti na způsobu podání zůstává po aplikaci 10-30% reziduálního objemu přípravku v zařízení. Snížené množství nebo úplné chybění konzervačních látek dosažené s těmito zařízeními vyžaduje plnění za aseptických podmínek, což je vhodné pouze pro drahé a citlivé sloučeniny.³²

8.5.1.2 Stlačitelné vícedávkové obaly

Stlačitelné obaly jsou hladké plastové lahvičky s otvorem ve tvaru trysky. Po stisknutí lahvičky je určitý objem vystříknut ven ve formě kapiček pomocí vzduchu stlačeného v lahvičce. Po opětovném uvolnění tlaku je opět vzduch nasáván dovnitř lahvičky. Díky tomuto procesu je celý systém náchylný ke kontaminaci

mikroorganismy a nosním hlenem nasátým dovnitř. Přesnost dávky a místo uložení tekutiny je závislé na způsobu podání. Tato zařízení se používají zejména pro podávání nosních dekonjestans.³²

8.5.1.3 Spreje s předem odměřenými dávkami

Jedná se o nejrozšířenější zařízení pro podávání nosních přípravků. Dovolují podávání určených dávek s vysokou přesností a umožňují podání dávky v objemu 25-200 μ l. Zařízení se skládá ze zásobníku, pumpičky, ventilu a pohonu. Vlastnosti spreje se liší v závislosti na vlastnostech léčivé látky, mechanismu předhuštění a vybraného pohonu a ventilu. Délka aplikátoru je důležitým faktorem určujícím umístění léčiva v nose.¹²

8.5.2 Systémy pro práškové přípravky/Insuflátory

Dosažená velikost částic bývá často větší ve srovnání s velikostí částic prášku díky nedostatečné deagregaci částic a má za následek velký rozptyl ve vzorci umístění. Mnoho insuflátorových systémů pracuje s dávkami předpřipravenými v tobolkách. Užití želatinových tobolek umožňuje plnění a podání různých množství prášku.

8.5.2.1 Jednodávkové inhalátory

K zajištění vysoké přesnosti dávek pro transnasálně podávané prášky je možná aplikace pomocí jednodávkových zařízení, podobných malým jednodávkovým stříkačkám. Velikost částic podaného prášku je výsledkem velikosti částic léčivé látky a kvality deagregace prášku, která je určena způsobem pohonu. Nový vývoj umožňuje u těchto zařízení využít mrazově sušený prášek, který může být lyofilizován přímo v tomto zařízení. Stlačení pístu má za následek předběžné stlačení vzduchu ve vnitřní komoře. Nakonec píst prorazí membránu, která odděluje komoru od lyofilizované léčivé látky, a rozpínající se vzduch vytlačí obsah do nosních dutin. Velikost částic a uložení v nose je ovlivněno fyzikálními vlastnostmi mrazově sušeného prášku díky podmínkám při lyofilizaci a silou užitou při stlačení zařízení.³²

8.5.2.2 Tlakové vícedávkové inhalátory

Abychom dosáhli vyšší compliance u pacientů užívajících nosní dávkovače prášků, jsou vyvíjeny nové vícedávkové systémy. Tlakové vícedávkové inhalátory (MDI) byly původně určeny pro podávání léků plicní cestou a adaptace na nosní použití proběhla díky změně tvaru ústí dávkovacího zařízení. Jsou vyráběny suspendováním mikronizované léčivé látky za pomoci surfaktantů v tekutém propelentu. Fyzikálně-chemická kompatibilita aktivní složky a dispergujícího činidla s propelentem musí být pečlivě vyhodnocena.³²

Kombinace různých hnacích plynů ovlivní tlak par a fyzikální stabilitu aerosolového systému. Separace fází, dispersibilita, růst krystalů, polymorfismus, a adsorpční vlastnosti částic suspendovaného léčiva mají vliv na velikost částic, distribuci dávky a vzor/způsob uložení.³²

Výhodou MDI je jejich přenosnost a malá velikost, schopnost poskytnout široké rozmezí dávek, shodnost dávek, přesnost dávek, ochranu obsahu a pohotovost k použití. Nevýhodou MDI jsou možné podráždění propelentem nebo tenzidem a špatné fungování v chladném prostředí. Hnací plyny používané v MDI mohou dráždit a vysoušet slizniční membrány. Navíc mají propelenty a surfaktanty, jako sorbitan oleát, tlumivý účinek na aktivitu řasinek.³²

9 Transnasální aplikace peptidů

Rodina klinicky používaných peptidových hormonů se pozvolna rozrůstá. Obvyklou překážkou plnohodnotného použití peptidových hormonů je skutečnost, že nemohou být podávány orálně, protože podléhají procesu trávení a inaktivaci v trávicím traktu a významnému first-pass metabolismu v játrech. To znamená, že peptidová léčiva musí být podávána parenterálně.³⁴

Tradiční způsob identifikace peptidového hormonu zahrnoval vyjmutí endokrinní tkáně, pozorování následků odejmutí, injekce extraktu získaného z odejmuté tkáně. Příkladem tohoto postupu jsou insulin a růstový hormon. K expanzi přispěly velkou měrou sofistikovanější technologie, peptidové hormony byly nejdříve získávány chemickou syntézou a později DNA rekombinantní technologií a můžeme očekávat, že dosud neznámé nebo nezjistitelné peptidové hormony budou produkovány transgenními zvířaty.³⁴

9.1 *Insulin*

Posledních asi 80 let je jediným způsobem podávání insulinu do organismu pro diabetiky s.c. injekce. Jedná se o aplikaci bolestivou, místo podání není fyziologické, v s.c. depu dochází k místní degradaci insulinu a k pomalé absorpci. Díky těmto nevýhodám se vědci snaží vyvinout neinvazivní způsoby podání insulinu. Jako alternativa injekčnímu podání v léčbě diabetu je rozsáhle zkoumán intranasální insulin.

Kromě léčby diabetu insulin prostupuje do mozku přes hemato-encefalickou bariéru pomocí receptor-dependentního transportu a účastní se regulace energetické homeostázy a reprodukčních a kognitivních funkcí. V posledních letech nabyli vědci přesvědčení, že insulin a insulinové receptory v mozku jsou nutné pro normální funkci neuronů a jakékoliv narušení tohoto systému vyvolává neurodegenerativní onemocnění.³⁵

Diabetes a objev insulinu

Diabetes mellitus (DM) byl poprvé popsán před více než 2000 lety. Přes jeho snadno definovatelné, charakteristické symptomy zůstal smrtelnou nemocí až do dvacátých let 20. století. Pojítka mezi diabetem a pankreatickou sekrecí bylo poprvé zaznamenáno v roce 1800 lékařem královny Viktorie, který si všiml přítomnosti krystalů v pankreatické tkáni mrtvých diabetiků. Toto spojení bylo potvrzeno následným výzkumem, který popsal rozvoj diabetu do 2 dnů u psů, kterým byl odebrán pankreas. Insulin jako antidiabetický činitel byl poprvé popsán v roce 1921 dvěma kanadskými fyziology, Frederickem Bantingem a Charlesem Bestem, kteří pracovali v laboratořích Johna MacLeoda na univerzitě v Torontu.³⁶

Podle Světové zdravotnické organizace trpí diabetem asi 180 miliónů lidí. Předpokládá se, že se toto číslo do roku 2030 zdvojnásobí.⁴⁵ Tato nemoc ročně zabije 3,2 miliónů lidí.³⁶

DM je chronické metabolické onemocnění, které vzniká na základě neschopnosti organismu tvořit hormon insulin a/nebo adekvátně odpovědět na přítomnost cirkulujícího insulinu v krevním oběhu. Rozlišujeme 2 druhy diabetu – typ 1 a typ 2. Diabetes 1. typu (také označovaný jako insulin-dependentní diabetes mellitus/IDDM) je charakteristický absolutní ztrátou schopnosti organismu vytvářet insulin, způsobenou selektivní autoimunitní destrukcí β -buněk pankreatu. Diabetes 2. typu (známý jako non-insulin-dependentní diabetes mellitus/NIDDM) je spojen s relativním nedostatkem insulinu a rezistencí organismu k působení insulinu.⁴⁵

Léčba insulinem je nezbytná pro přežití u nemocných s diabetem 1. typu (tzv. insulin-dependentní diabetes mellitus/IDDM) a dále se používá ke kontrole nebo zabránění dalšího rozvoje nemoci u malé části nemocných s častějším diabetem 2. typu (tzv. non-insulin dependentní diabetes mellitus/NIDDM).³⁶

Struktura insulinu

Jedná se o anabolický a antikatabolický peptid s molekulovou hmotností okolo 6000 Da produkovaný β -buňkami Langerhansových ostrůvků v pankreatu. Je tvořen dvěma peptidovými řetězci. Řetězec A je tvořen 21 aminokyselinami a řetězec B tvoří 30 aminokyselin. Tyto dva řetězce jsou spojeny dohromady disulfidickými

můstky mezi molekulami přítomného cysteinu. Ačkoliv se pořadí aminokyselin liší podle druhu, určité sekvence v molekule jsou velmi konzervativní, jedná se o umístění disulfidických vazeb, oba konce řetězce A a C-terminální zbytek B řetězce.³⁷

Insulin kontroluje uchovávání a metabolismus sacharidů, bílkovin a tuků primárně v játrech, ve svalech a tukové tkáni, a to díky navázání molekuly insulínu na receptorové místo v cytoplazmatické membráně. Poločas u zdravých lidí a pacientů s nekomplikovaným diabetem je 5-6 minut. Odbourávání insulínu se děje zejména v játrech, ledvinách a ve svalech. Asi 50% insulínu, který se dostane do jater portální žílou, je rozloženo a nikdy se nedostane do krevního oběhu. Insulin je filtrován v renálních glomerulech a reabsorbován v tubulech, kde je také odbouráván.³⁷

Farmakokinetika insulínu

U zdravých lidí se insulin typicky uvolňuje kontinuálně na nízké bazální hladině s rychlým, ale přechodným zvýšením, které spouští zvýšená hladina glukózy. Endogenní hladina insulínu dosahuje vrcholu 30 minut po požití potravy a vrací se na bazální úroveň další 2 hodiny.³⁸ Jako následek nízké biologické dostupnosti po orálním podání a současně nedostatku jiných možností podání, je insulin v současné době podáván parenterálně. Konvenční insulinová terapie však nedokáže přesně napodobit endogenní vzor uvolňování.³⁶

Biologicky aktivní insulin existuje v monomerní formě a normální koncentrace v krvi je okolo 10^{-10} M. V komerčně vyráběných přípravcích je insulin v mnohem vyšších koncentracích (asi 10^{-3} M). Při takovýchto koncentracích existuje především v oligomerní formě jako hexamer insulínu obsahující atom zinku. Hexamer se skládá ze tří shodných dimerů spojených dohromady atomy zinku. Tyto komplexy se musí nejdříve oddělit, aby mohly být absorbovány z místa podání do krevního oběhu. Výsledkem je, že insulin podaný ve formě podkožní injekce má pomalejší nástup a delší trvání účinku ve srovnání s endogenní sekrecí insulínu po požití potravy. Maximální koncentrace v plazmě není dosaženo dříve než za 2 hodiny a zvýšená hladina přetrvává více než 5 hodin.³⁶

Ve snaze co nejlépe napodobit fyziologický vzor, jsou konvenční insuliny podávány 30 a více minut před jídlem a diabetik by neměl následně měnit plánovanou dobu jídla. Vedle těchto rychle působících produktů jsou dále vyráběny přípravky se zpomaleným vstřebáváním do krevního oběhu. Tyto pomalu působící přípravky mohou být podávány pacientům k napodobení bazální endogenní sekrece insulínu. Dlouho působící insuliny jsou obvykle připravovány z rozpustných insulinů tvorbou suspenzí insulinů. To dále snižuje míru disociace insulínu na jednotlivé monomery po injekčním podání. Insulinové suspenze mohou být vyráběny přidáním zinku nebo protaminu (bazický polypeptid, se kterým tvoří insulin komplexy).³⁶

Farmakokinetika intranasálního podání je podobná intravenóznímu podání. Aplikace u zdravých dobrovolníků ukázala nástup účinku během 10 minut po podání a maximálního, na dávce závislého efektu na snížení glukosy, bylo dosaženo po 20-45 minutách a účinek přetrvával po dobu 90-120 minut.³⁹ V jedné ze studií bylo zjištěno, že intranasální insulin je nejméně účinný odpoledne.⁴⁰

Zjištěná biologická dostupnost intranasálně podaného čistého roztoku insulínu je $0,5 \pm 0,1\%$.⁴¹

Studie zahrnující 31 subjektů s DM 1 typu ukázala, že dávka nosního insulínu musí být nejméně 20 x vyšší než při podkožní aplikaci, aby bylo dosaženo určených hodnot glykemické kontroly. Kromě toho po nosním podání koncentrace sérového insulínu vzrostla rychleji a klesla svižněji než při podkožním podání.⁴²

Během studie probíhající 4 měsíce na 10 pacientech s diabetem 2. typu léčených intranasálním insulinem bylo dosaženo srovnatelné kontroly glykémie s NPH insulinem podávaným 2 x denně injekčně, ačkoliv střední hodnota glykovaného Hb zůstala vysoká. Samotný roztok intranasálního insulínu dosáhl adekvátní kontroly glykémie u 3 z 10 subjektů.⁴³

Insulin v isoosmotických přípravcích vykázal slabší účinek na snížení hladiny glukózy v krvi než při podání v hypo- nebo hyperosmolárních přípravcích. Podobné zvýšení permeability bylo pozorováno v přípravcích připravených z deionizované vody než v přípravcích obsahujících fosfátový pufr s hodnotou pH 7,4.⁴⁴

9.2 Kalcitonin

Kalcitonin je peptidový hormon složený z 32 aminokyselin s molekulovou hmotností 3 432 Da. Je produkován parafolikulárními buňkami nebo C buňkami štítné žlázy. Byly identifikovány tři třídy kalcitoninu a každá má odlišnou účinnost v inhibici kostní resorpce. V terapii se používá lososí kalcitonin, protože má jednodušší strukturu než kalcitonin savců.⁴¹

Lososí kalcitonin se používá k léčbě postmenopauzální osteoporózy a Pagetovy nemoci. Intranasální podání lososího kalcitoninu se setkává se smíšenými výsledky. V krátkodobé studii hodnotící analgetický účinek intranasálního kalcitoninu na bolest způsobenou při stenóze lumbálního kanálu nebyl účinek vyšší než u placebo.⁴¹ Navíc ve srovnávací studii byl kalcitonin méně účinný než novější léčivé přípravky jako bisfosfonáty. Jeho biologická dostupnost po intranasálním podání byla značně přehlížena. Teprve nedávno se této záležitosti dostalo pozornosti a ukázalo se, že jako v případě lidského kalcitoninu je i lososí kalcitonin absorbován významnějším způsobem teprve po přidání promotérů.³⁴

Při zkoumání schopnosti nabitých liposomů obsahujících kalcitonin zlepšit absorpci kalcitoninu u králíků bylo pozorována signifikantní hladina akumulace pozitivně nabitých liposomů na negativně nabitěm povrchu nosní sliznice. Byly spočítány farmakokinetické parametry a koncentrace kalcitoninu v plazmě a schopnost zvýšit biologickou dostupnost kalcitoninu byla stanovena v tomto pořadí: kladně nabitě liposomy obsahující kalcitonin>záporně nabitě liposomy obsahující kalcitonin>roztok kalcitoninu.²¹

9.3 Další léčivé látky peptidové nebo proteinové povahy

Glukagon

Glukagon je lineární polypeptid složený z 29 aminokyselin s molekulovou hmotností 3 482 Da. Tvoří se v alfa-buňkách (též A-buňkách) pankreatu a je uložen v sekrečních granulech.⁶

Intranasální glukagon, získaný buď extrakcí nebo rekombinantní technologií, spárovaný s promotérem je schopen zvýšit hladinu glukózy v krvi u zdravých osob a je také schopen působit proti výskytu úmyslných nebo spontánních

hypoglykemických epizod u dospělých i dětí postižených IDDM. Účinnost takto podaného glukagonu se neliší od glukagonu podaného i.m. Farmakokinetika intranasálního glukagonu byla detailně studována a zdá se, že nejsou žádné významné překážky v jeho uvedení na trh. Kvůli omezení výskytu hypoglykemií se zdá přijatelné nabídnout všem pacientům, kteří mají sklon k hypoglykemickým epizodám, šanci na efektivní selfmedikaci.³⁴

Desmopressin

Desmopresin, což je analog vasopresinu s molekulovou hmotností 1 069 Da, je komerčně dostupný v několika lékových formách zahrnujících tablety, rychle rozpustné tablety a nosní sprej. Míra absorpce je u každé z těchto tří forem odlišná. Nosní sprej má nejvyšší absorpční kapacitu (3-5%).⁶ Desmopresin se běžně používá pro léčbu centrálního diabetes insipidus a koagulačních poruch způsobených vrozenou absencí faktoru VIII.³⁴

Agonisté hormonu uvolňujícího luteinizační hormon

Agonisté hormonu uvolňujícího luteinizační hormon (LHRH) buserelin, nafarelin a leuprolid jsou užívány ve formě nosních přípravků k léčbě různých nemocí (rakovina prostaty, endometrióza, předčasná puberta). Jedná se o malé peptidové hormony, které jsou složeny z 9-10 aminokyselin. Nosní přípravky obsahující tyto léčivé látky mají nízkou biologickou dostupnost (např. buserelin 3%, nafarelin 2,8%).⁶

Lidský růstový hormon

Lidský růstový hormon (hGH), neboli somatotropin, je protein s molekulovou hmotností 22 124 Da, který se skládá ze 191 aminokyselin. Uvolňování růstového hormonu je regulováno růstový hormon uvolňujícím hormonem a somatostatinem.⁴¹ Používá se při léčbě nedostatečné produkce tohoto hormonu, Turnerově syndromu a chronickém selhání ledvin. Injekční přípravky s touto látkou jsou již na trhu dostupné. Stejně jako u jiných proteinů a peptidových léčiv byly studovány i neinvazivní způsoby podání. Všeobecně se soudí, že nosní podání může lépe

napodobit normální, endogenní uvolňování v pulzech ve srovnání s injekčním podáním.⁶

Somatostatin

Somatostatin je hormon produkováný D-buňkami Langerhansových ostrůvků slinivky břišní, buňkami hypothalamu a dalšími tkáněmi. Tento hormon tlumí uvolňování růstového hormonu, dále tlumí uvolňování hormonu stimulujícího štítnou žlázu a inhibuje uvolňování žaludečních a střevních hormonů. Jeho syntetický analog oktreotid je oktapeptid s molekulovou hmotností 1 019 Da.⁶ Bylo zjištěno, že inhibicí hGH uvolňovaného během nočních hodin snižuje ranní hladinu glukózy u pacientů DM 1. Terapeuticky se oktreotid využívá v léčbě akromegalie.³⁴

10 Metody zvýšení biodostupnosti transnasálních peptidů

Mezi faktory ovlivňující přechod léčiv přes nosní sliznici a jejich biologickou dostupnost patří fyzikálně-chemické vlastnosti (ionizace, lipofilita, atd.) léčiv, povrchový náboj a hydrofobičnost stejně jako molekulová hmotnost, což je jeden z nejdůležitějších faktorů. Hydrofilní léčiva s nízkou molekulovou hmotností jsou absorbována přes nosní sliznici téměř ve stejném rozsahu jako léčiva podávaná intravenózně. Nosní sliznice je však překážkou pro prostup velkých molekul, obzvláště s velikostí nad 1000 Da, to znamená, že biologická dostupnost hydrofilních peptidů a proteinů je menší než 1%. Ke zlepšení nosní absorpce molekul peptidů a proteinů se proto používají různé postupy, které lze shrnout do následujících bodů:

- a) Změna chemické struktury peptidů vedoucí ke zvýšení metabolické stability a/nebo membránové permeability.
- b) Aplikace léčiv s inhibitory enzymů, které je chrání před působením těchto enzymů v nosní sliznici. Široké spektrum enzymů vede k pseudo-first pass efektu, který brání vstřebávání peptidů a proteinů.
- c) Látky usnadňující absorpci (jako soli žlučových kyselin a tenzidy, deriváty fusidové kyseliny, fosfatidylcholinu a cyklodextriny) používané ke zlepšení průchodu léčiv s polární strukturou přes nosní sliznici.
- d) Nové lékové formy, které umožňují prodloužení času, po který zůstává léčivo na sliznici, do této skupiny lze zahrnout nosičové systémy (lipozomy, emulze lipidů, niosomy, nano- a mikročástice).⁶

10.1 Změna chemické struktury

Změna v primární struktuře peptidu nebo tvorba proléčiv může ochránit léčivou látku před proteolytickým rozkladem nebo zlepšit její vlastnosti podstatné pro průchod nosní sliznicí.

Byly zaznamenány chemické modifikace proteinů a peptidů pomocí některých makromolekulárních látek jako polyethylenglykol, kopolymer polystyrenu a

maleinové kyseliny, albumin a dextran. Sterická ochrana poskytnutá pegylací chrání konjugát před proteolýzou, kryje před imunitním systémem a snižuje jeho míru transportu z oběhového systému. Pegylace insulínu bohužel zvyšuje jeho hydrofilitu, molekulovou hmotnost a velikost, takže není vhodná pro intranasální přípravky.⁴⁵ Proléčiva se historicky používala k překonání nepříjemné chuti, nízké rozpustnosti, nedostatečné stability (jak chemické tak enzymatické), neúplné absorpce přes biologické membrány a předčasněho metabolismu u nereagujících druhů. Termín proléčivo byl dříve určen pro sloučeniny, které podléhaly biotransformaci dříve, než mohly projevit svůj farmakologický účinek. Dnes chemie proléčiv zahrnuje většinu okruhů syntetické organické chemie, hlavní zájem se zaměřuje na zlepšení fyzikálně-chemických potřeb a tím zlepšení biologických vlastností rodičovské části v dočasné podobě.⁴⁶ Toto všechno směřuje nakonec k překonání vnitřních vlastností spojených s použitím mateřské léčivé látky. Problém trvale přítomný v rodičovské molekule může být odvozený od specifické funkční skupiny. Takže zřejmé řešení tohoto problému zahrnuje přechodné změny maskováním nebo zakrytím této funkční skupiny jinou funkční skupinou. Tato kombinace dvou funkčních skupin vede k vytvoření nové sloučeniny, která se obvykle projevuje novými fyzikálně-chemickými vlastnostmi. Nicméně má tato kombinace úplný potenciál vrátit se zpět na rodičovské sloučeniny in vivo nebo za vhodných mezních podmínek. Toto spojení dvou funkčních skupin, dávající vzniknout nové molekulové jednotce, je označováno jako proléčivo.⁴⁶

Většinu proléčiv je možno rozdělit do dvou skupin. První typ proléčiv je ten, ve kterém je funkční skupina dávající proléčivu jeho charakteristické fyzikálně-chemické vlastnosti, přímo vázaná na funkční skupinu mateřské léčivé látky, která má být dočasně zakryta. Druhý typ proléčiva je ten, ve kterém je funkční skupina v proléčivu oddělena od funkční skupiny mateřské léčivé látky pomocí methylenové skupiny nebo vinylové skupiny.⁴⁶

Ideální peptidové proléčivo by mělo vykazovat zlepšení permeační charakteristiky při průchodu membránami a zvýšenou stabilitu proti enzymovému odbourávání. Po průchodu membránou by mělo proléčivo prodělat spontánní nebo enzymatickou

přeměnu, která mu pak umožní předvést jeho farmakologický efekt. Bylo dokázáno, že příprava cyklických proléčiv za použití funkčních skupin na C- a N-koncích peptidu minimalizuje metabolickou degradaci endopeptidázami. Navíc cyklizace peptidu může omezit konformační flexibilitu molekuly, a to vede ke kompaktnější molekule se změněnými fyzikálně-chemickými vlastnostmi.⁴⁶

10.2 Inhibitory nosních enzymů

Inhibitory proteolytických enzymů mohou zabránit hydrolýze proteinů a peptidických léčiv v nosní dutině, a tak zvýšit stabilitu léčiv v místě absorpce. Ke stabilizaci peptidových léčiv při jejich intranasální absorpci se využívají derivátů α -aminoboronové kyseliny (α -aminoboronic acid derivatives). Boroleucin, reverzibilní inhibitor proteázy, byl účinnější než další používané inhibitory bestatin a puromycin. Nejlepším výběrem pro zvýšení biologické dostupnosti peptidových a proteinových léčiv díky jejich molekulové hmotnosti a schopnosti inhibovat účinek různých proteolytických enzymů jsou boroleucin a dipeptid fosfonové kyseliny.⁴⁷ Např. camostat mesilát je inhibitor aminopeptidázy a trypsinu a zlepšuje intranasální podávání vasopresinu a desmopresinu. Inhibitory s anti-trypsinovou aktivitou usnadňují nosní vstřebávání lososího kalcitoninu. Přesto inhibitory proteolytických enzymů sami o sobě nedokáží usnadnit průchod léčivé látky přes epitheliální membránu, a tudíž nejsou obecně schopny významně zlepšit biologickou dostupnost v nepřítomnosti dalších látek usnadňujících absorpci. Kromě toho ovlivňují enzymové inhibitory normální metabolismus v těle, což má za následek vážné nežádoucí účinky.⁴⁵

Přestože nejsou žádné zprávy o inhibitorech enzymů používaných pro nosní absorpci insulinu, většina studií ukazuje, že použití inhibitorů nosních enzymů není účinnou a bezpečnou metodou pro zlepšení nosní absorpce insulinu.⁴⁵

10.3 Látky usnadňující nosní absorpci

Použití látek usnadňujících absorpci nebo urychlovačů nosní absorpce je nejčastější přístup ke zlepšení nosní absorpce. Užívá se zejména u látek s nízkou absorpcí a sloučenin s vysokou molekulovou hmotností.⁴⁵

Přesný mechanismus působení látek usnadňujících absorpci není znám. Nicméně všeobecně se předpokládá, že tyto látky ovlivňují absorpci jedním nebo oběma následujícími mechanismy: a) některé sloučeniny mohou změnit fyzikálně-chemické vlastnosti léčivé látky v přípravku např. změnou rozpustnosti, rozdělovacího koeficientu nebo pomocí slabých iontových interakcí s účinnou látkou přičemž tento mechanismus ovlivnění absorpce je žádoucí, protože může snížit potenciální toxicitu účinné látky, b) větší množství látek ovlivňuje povrch nosní sliznice, zvyšuje membránovou fluiditu, tvoří přechodné hydrofilní póry nebo otevírá těsná spojení, ale je třeba zdůraznit, že tento efekt není vždy nezbytně škodlivý.⁴⁸

Ideální sloučenina usnadňující nosní absorpci by měla mít tyto vlastnosti:

- farmakologicky inertní,
- nealergizující, netoxická a nedráždivá,
- vysoce účinná,
- kompatibilní se širokou škálou léčivých látek a pomocných látek,⁴⁸
- bezbarvá, bez chuti a bez zápachu,
- levná a snadno dostupná ve vysoké čistotě,
- přijatelná pro regulační authority na celém světě.^{27,2}

10.3.1 Cyklodextriny

Cyklodextriny (CD) jsou cyklické oligosacharidy odvozené od škrobu obsahující 6 a více α -D-glukopyranosových jednotek. CD zaujímají díky židličkové konformaci glukopyranosy tvar trychtýřovitého kužele nebo prstence místo dokonalého válce. Jejich periferní hydrofilní oblast a hydrofobní dutina mohou chemicky interagovat s proteiny a předpokládá se, že tak stabilizují jejich strukturu před denaturací. Zatím jsou známy čtyři možné mechanismy ovlivnění absorpce a tím zlepšení biologické dostupnosti léčivých látek tvořících komplexy s CD: a) CD zvyšují rozpustnost, míru rozpouštění a smáčivost ve vodě špatně rozpustných léčivých látek; b) CD brání rozkladu chemicky nestabilních léčivých látek; c) CD narušují tekutost membrán, dochází ke snížení ochranné funkce, což následně usnadňuje absorpci léčivých látek přes nosní sliznici a d) mohou tvořit kompetitivní inkluzní komplexy s dalšími

sloučeninami (žlučové kyseliny, cholesterol, lipidy), aby došlo snáze k uvolnění navázané léčivé látky.⁴⁹

V posledních letech probíhá aktivní výzkum cyklodextrinů a jejich derivátů. Bylo zjištěno, že relativní efektivita cyklodextrinů, zkoušených pro usnadnění nosní absorpce insulínu, klesá v následující řadě: dimethyl- β -CD (5% w/v) > α -CD (5% w/v) > β -CD (1,8% w/v) > hydroxypropyl- β -CD (5% w/v) > γ -CD (5% w/v). Mezi zkoumanými CD je nejsilnějším promotérem dimethyl- β -CD a práškové přípravky jsou účinnější než tekuté přípravky.⁴⁵

Zlepšení absorpce přinášené díky CD může být připisováno primárně jejich schopnosti redukovat fyzikální a/nebo metabolické překážky při absorpci peptidů a proteinů. CD mohou chránit peptidy a proteiny před enzymatickou stejně jako chemickou degradací tím, že začlení hydrofobní postranní řetězce peptidu do dutiny cyklodextrinu nebo přímo inhibují proteolytické enzymy. Hydrofilní CD mohou odklidit některé specifické lipidy z biologických membrán díky rychlé a reversibilní tvorbě inkluzních komplexů, která vede ke zvýšení permeability membrán. CD mohou přímo reagovat s hydrofobními řetězci molekul peptidových a proteinových molekul a změnit jejich vnitřní agregaci nebo permeabilitu při průchodu přes fosfolipidovou dvouvrstvu. CD mohou měnit rozložení proteinů těsných spojů, čímž otevírají těsné spoje mezi epitheliálními buňkami a zvyšují permeabilitu.⁴⁵

CD mohou být použity ke snížení podráždění způsobené léčivými látkami. Vzrůst účinnosti a tím snížení dávky požadované pro optimální terapeutickou aktivitu může snížit toxicitu léčiva tím, že se stane účinným při nižších dávkách.⁴⁹

U králíků a potkanů vedlo podání lososího kalcitoninu s methylovaným β -cyklodextrinem v 5% koncentraci ke zlepšení nosní absorpce, měřené snížením koncentrace vápníku v krvi. Tento účinek byl srovnatelný s i.v. nebo s.c. podáním.⁵⁰

Podání tekutých nebo práškových přípravků obsahujících glukagon a dimethyl- β -cyklodextrin zvýšilo biologickou dostupnost glukagonu u králíků o více než 80% ve srovnání s podkožní aplikací.⁵⁰

Nosní absorpce insulínu u lidí v přítomnosti cyklodextrinů však není dostatečná pro terapeutické využití. Použitím přípravku složeného z intranasálního insulínu a

dimethyl- β -cyklodextrinu byla dosažena biologická dostupnost u zdravých dobrovolníků 3,4% a u pacientů s DM 5,1%⁵⁰

10.3.2 Deriváty kyseliny fusidové

Kyselina fusidová byla vyvinuta jako velmi účinné antibiotikum s výborným bezpečnostním profilem u lidí.⁴⁸

Nejčastěji studovaným derivátem kyseliny fusidové je tauro-24,25-dihydrofusidát sodný (STDHF). Na základě svých vlastností byl STDHF označen jako vhodný kandidát pro intranasální podání léčivých látek jako jsou insulin, lidský růstový hormon, kalcitonin a oktreotid.⁵⁶

STDHF byl vyvinut jako antibakteriální činidlo, takže byla studována jeho krátkodobá i dlouhodobá toxicita. Fyzikálně-chemické vlastnosti derivátů kyseliny fusidové jsou podobné derivátům žlučových solí. STDHF byl studován jako látka usnadňující absorpci proteinů a peptidových molekul. Biologická dostupnost inzulinu s přidavkem 1 % STDHF se u potkanů a králíků pohybovala v rozmezí 5-18 %. Při srovnávací farmakokinetické studii na ovcích bylo pozorováno 21-násobné zvýšení biologické dostupnosti u nosního podání lidského růstového hormonu s 0,5% roztokem STDHF.²⁷

Intranazální podání lidského růstového hormonu (hGH) ve směsi s STDHF v 1% koncentraci vedlo u pacientů s nedostatkem hGH k podobnému průběhu jako u endogenního uvolňování.⁵⁶

10.3.3 Kationické polymery

Kationické polymery se zdají být, mezi novými látkami usnadňujícími absorpci, jako nejefektivnější a nejbezpečnější látky zlepšující transport insulinu. Mohou ovlivňovat lumenální povrch slizničních membrán přímo interakcí ion-ion a tím indukovat signál, který otevírá těsné spoje, což vede ke zlepšení mezibuněčného prostupu látek.⁴⁵

10.3.3.1 Chitosan a jeho deriváty

Chitosan a jeho deriváty jsou nejznámější látky usnadňující absorpci s dobrým bezpečnostním profilem. Chitosan je kladně nabitý lineární polysacharid, vyráběný deacetylací z chitinu přítomného ve schránkách korýšů a je dostupný v širokém rozmezí molekulových hmotností, úrovní viskozity a stupňů deacetylace.⁴⁵ Chitosan je nerozpustný při neutrálním a zásaditém pH, ale vytváří ve vodě rozpustné soli s anorganickými a organickými kyselinami, jako jsou glutamová kyselina, chlorovodíková kyselina, mléčná kyselina a octová kyselina. Preferovanou formou je sůl glutamové kyseliny díky lepší schopnosti usnadnit absorpci.⁵¹

Bylo dokázáno, že chitosan je bioadhezivum a je schopný silně reagovat se záporně nabitými složkami buněk nosního epitelu a nad ním ležící vrstvy hlenu, čímž poskytuje prodloužení doby kontaktu při transportu insulínu přes nosní membránu dříve, než je přípravek odstraněn mechanismem mukociliárního transportu. Zlepšující účinek byl vyšší, pokud měl chitosan vyšší molekulovou hmotnost a nižší stupeň deacetylace (vyšší kladný náboj). Navíc jednorázová ani dlouhodobá aplikace (28 dní) chitosanu nezpůsobuje na nosní sliznici žádné zjevné poškození tkáně. Navzdory těmto výborným vlastnostem má chitosan jednu významnou nevýhodu, jeho rozpustnost při pH nad 6 velice nízká. Při fyziologickém pH chitosan z roztoku precipituje a ztrácí svojí schopnost zvyšovat permeabilitu léčivých látek a absorpci, které je možno dosáhnout pouze v jeho protonované formě v kyselém prostředí.⁴⁵

Bylo zjištěno, že přípravky s insulinem obsahující roztok chitosanu nebo práškový chitosan jsou lepší než nanočástice tvořené chitosanem a insulinem. Biologická dostupnost práškových přípravků byla 17% proti 1,3 a 3,6% u nanočástic a roztoků. Vliv koncentrace a osmolarity chitosanu a přítomnost látek usnadňujících absorpci v roztoku s chitosanem na permeaci insulínu přes nosní sliznici králíka byl zkoumán in vivo a in vitro a stejná pozorování byla prováděna i u potkanů. Výsledky ukázaly, že se zvyšující se koncentrací insulínu v rozmezí 0 až 1,5% je možné zvýšit permeaci insulínu in vitro. Ve srovnání s podáním samotného insulínu došlo k 25-násobnému zvýšení permeačního koeficientu při podání insulínu s 1,5% roztokem chitosanu. Zvýšená permeabilita byla pozorována při použití 5% roztoku hydroxypropyl-β-

cyklodextrinu a 1% chitosanu s insulinem ve srovnání s podáním se samotným chitosanem. Nebyl zjištěn žádný statisticky významný rozdíl v permeabilitě, pokud byl insulin podáván s 0,1% kyselinou ethylendiamintetraoctovou a 1% chitosanem.

Ve studiích in vivo u potkanů neukázal insulin bez chitosanu žádné snížení hladiny glukózy, ale se stoupající koncentrací chitosanu byl pozorován hypoglykemizující efekt. S přípravkem obsahujícím 0,5% chitosanu bylo dosaženo spodní hladiny glukózy asi 1 hodinu po podání, u přípravků s 1 a 1,5% chitosanu bylo dosaženo nejnižší úrovně během 2 hodin. V případě isoosmolárních přípravků byla nejnižší dosažená hladina koncentrace glukózy slabší ve srovnání s hypo a hyperosmolárními roztoky. Pokud byl insulin podáván s 1% chitosanem, došlo také ke snížení hladiny glukózy a stejný účinek byl dosažen s 1% chitosanu a 0,1% EDTA nebo v případě 5% tweenu 80. Tato studie ukazuje, že koncentrace, osmolarita, médium a použití látek usnadňujících absorpci v roztocích chitosanu následně ovlivňuje absorpci intranazálně podávaného insulinu.⁴⁴

N-trimethylchitosan chlorid (TMC), částečně kvarternizovaný derivát chitosanu, naproti tomu vykazuje výbornou rozpustnost ve vodě v širokém rozmezí pH a při různých koncentracích. Důvodem zlepšení rozpustnosti je substituce primární aminoskupiny methylovou skupinou a předejití tvorby vodíkových vazeb mezi aminoskupinou a hydroxylovou skupinou chitosanového řetězce. TMC má také bioadhezivní vlastnosti a zvyšuje permeabilitu při neutrálním i bazickém pH. Stupeň kvarternizace TMC hraje důležitou roli v rozpustnosti, ve schopnosti usnadnit absorpci a v mukoadhezivních vlastnostech tohoto polymeru. Hustota náboje této molekuly ovlivňuje interakce mezi polymerem a negativně nabitými místy na buněčných membránách a/nebo uvnitř těsných spojů.⁴⁵

Vzhledem k nízké toxicitě, biologické kompatibilitě, biologické odbouratelnosti a mukoadhezivním vlastnostem a modulačnímu efektu na těsné spoje jsou chitosan a jeho deriváty slibnými kandidáty na prostředky pro zlepšení absorpce v klinické praxi.⁴⁵

10.3.3.2 Poly-L-arginin

Poly-L-arginin nabízí dobrý kompromis mezi schopností usnadňovat absorpci a bezpečností pro intranasální peptidy a proteiny. Stejně jako u chitosanu se jedná o polymerní sloučeninu nesoucí síť kladných nábojů a účinek je závislý na molekulové hmotnosti.⁵² Poly-L-arginin u králíků snižuje výskyt proteinů junkčního komplexu a mění jejich distribuci přesunem do cytoplazmy, což zřejmě vede ke zlepšení paracelulární prostupnosti nosní sliznice. Basolaterální aplikace poly-L-argininu transport látek nezvyšuje.⁵³

10.3.3.3 Kationická želatina

Želatina má sama o sobě bioadhezivní vlastnosti a je schopná poskytnout prodloužený kontakt insulínu s membránou při transportu. Kationizace umožňuje želatině působit na lumenální povrch slizniční membrány přímo interakcí ion-ion a indukovat tak signál otevírající cestu pro intercelulární permeaci. Aminovaná želatina s vyšší molekulovou hmotností a většími aminoskupinami byla v usnadnění absorpce insulínu účinnější.⁴⁵

10.3.4 Membránou penetrující peptidy

Membránou penetrující peptidy (CPP, také známé jako protein transduction domain) jsou novou třídou peptidů zmiňovanou poprvé v roce 1994, kdy byla objevena první sloučenina z této skupiny-penetratin. CPP usnadňují přestup hydrofilních makromolekul (např. proteinů, DNA, oligonukleotidů) přes plazmatickou membránu bez změny jejich aktivity jak in vitro, tak in vivo.⁵⁴

Nejúčinnější látkou mezi CPP usnadňující absorpci insulínu je L-penetratin. Vyrůstající koncentrace L-penetratinu zlepšuje u potkanů prostupnost nosní sliznice pro insulín znatelněji než samotný roztok insulínu. Léčba obsahující 0,2 mM L-penetratinu vedla k 8,8-násobnému zvýšení relativní biologické dostupnosti, zatímco 2 mM roztok L-penetratinu zvýšil dostupnost insulínu 30-násobně ve srovnání se samotným roztokem insulínu. Naproti tomu podání insulínu v roztoku s D-penetratinem ve stejných koncentracích absorpci insulínu snižuje.⁵⁵

Mechanismus vstupu CPP do buňky je stále intenzivně studován. Existuje mnoho hypotéz, které by vysvětlovaly, jak tyto peptidy umožňují transport různých druhů

molekul a větších makromolekulárních struktur do buňky, ale žádná z nich nebyla ověřena. Jejich toxický efekt je také diskutabilní. Přestože není detailní mechanismus vstupu CPP do buňky znám, jejich schopnost překonávat membrány a schopnost dostat se do cytoplazmy poskytuje nový a slibný biologický nástroj pro překonání nízké permeability peptidových a proteinových léčivých látek.⁴⁵

10.3.5 Modulátory těsných spojů

Novým přístupem v usnadnění intranasálního podávání léčiv založeným na nedávných objevech molekulární biologie těsných spojů je zřetelné zlepšení biologické dostupnosti u malých molekul, peptidů, proteinů a oligonukleotidů nesplňujících Lipinského pravidlo pěti. Modulátory těsných spojů (TJM) dokážou otevřít těsné spoje bezpečně a reversibilně, čímž zvyšují prostupnost tkáně a transport léčivých látek. Nové pomocné látky ze skupiny modulátorů musí být chemicky stálé a musejí si udržovat schopnost usnadnění absorpce za podmínek platných pro skladování a terapeutické užití.⁴⁵

Lipidy modulující těsné spoje

Jako lipidy modulující těsné spoje byly identifikovány glykosylované sfingosiny, alkylglukosidy, oxidované lipidy a etherové lipidy. Alkylglykosidy obsahující maltózu nebo sukrosu připojenou na alkylové řetězce mezi C₁₀ a C₁₄ byly schopné zvýšit biologickou dostupnost insulinu. Podání nosního insulinového přípravku obsahujícího 0,5 % cocoát sukrosy (směs esterů sukrosy a mastných kyselin kokosového oleje) způsobuje rychlé a znatelné zvýšení hladiny plazmatického insulinu s doprovodným snížením hladiny glukózy. Bohužel bylo dokázáno, že buňky ošetřované alkylglukosidy v koncentraci 0,2-0,4% vykazovaly velmi vysokou ciliotoxicitu a nízkou životnost.⁴⁵

Peptidy modulující těsné spoje

PN 159, peptidová sekvence, byla identifikována jako nový TJM peptid schopný snižovat transepiteliální elektrický odpor napříč tkáňovou bariérou a zvyšovat paracelulární transport nízkomolekulárních látek i velkých molekul s rychlým

nástupem účinku, nízkou toxicitou a vysokým zachováním životnosti buněk. PN 159 by mohl být bezpečný a silný TJM peptid k zesílení nosního vstřebávání léčivých látek.⁴⁵

10.3.6 Donory NO

Oxid dusnatý, hlavní produkt sekrece savčích buněk, byl shledán jako důležitý regulátor a/nebo efektor mnoha jevů v kardiovaskulárním, nervovém a imunitním systému. Navíc je NO regulátorem epitheliálních těsných spojů a může zlepšit permeabilitu a absorpci léčiv procházejících různými slizničními membránami, ačkoliv přesný mechanismus účinku není znám. Nitroprussid sodný, donor NO, způsobuje závažné snížení mezibuněčného potenciálu a membránové rezistence u buněk nosního epithelu u zdravých subjektů. Tyto výsledky naznačují, že donory NO by mohly být účinné jako látky usnadňující absorpci pro proteiny a peptidová léčiva.⁴⁵

10.3.7 N-acetyl-L-cystein

N-acetyl-L-cystein (NAC) je účinné mukolytické činidlo, které se široce užívá v léčbě bronchopulmonárních nemocí ke snížení viskozity a přilnavosti hlenu a k usnadnění jeho odstraňování. Dlouhá historie v klinickém použití této sloučeniny naznačuje, že má pravděpodobně nízkou toxicitu a nezpůsobuje žádné místní podráždění. Uvádí se, že NAC má mírný efekt na usnadnění absorpce ve vysokých koncentracích (20%) pravděpodobně tak, že zvyšuje přístup léčivé látky k epitheliální membráně. Kombinace NAC a netoxického tenzidu může silně zvýšit nosní absorpci peptidů a proteinů a toto zlepšení je u suchých práškových přípravků významnější než u tekutých přípravků.⁴⁵

NAC zvýšil nosní absorpci hGH u potkanů a v kombinaci s cyklodextrinem v tekutém přípravku i u králíků zřejmě díky snížení počtu intermolekulárních vazeb mezi peptidovým léčivem a glykoproteinovými řetězci hlenu.²²

10.3.8 Tenzidy

Tenzidy jsou sloučeniny, které mají tendenci se shromažďovat na rozhraní mezi dvěma fázemi. Výsledkem je změna povrchové energie v mezifázi. V roztocích snižují povrchové a mezifázové síly ve vodě a napomáhají tvorbě micel a pěnových přípravků. Kromě žlučových kyselin se jedná třeba o deriváty mastných kyselin, fosfolipidy a synteticky připravené tenzidy.²²

Žlučové soli a jejich deriváty

Žlučové soli a jejich deriváty jsou široce využívány ke zlepšení nosní absorpce insulínu u lidí i na zvířecích modelech. Jedná se o amfifilní molekuly, mající zřetelné polární a nepolární oblasti. Ve vodných roztocích při nízké koncentraci existují ve formě monomerů, ale při hodnotách nad kritickou micelární koncentrací se samovolně shlukují za tvorby koloidních shluků označovaných jako micely, ve kterých je hydrofilní skupina vystavena vodnímu médiu a obklopuje hydrofilní jádro, a celá struktura je tak ve vodě rozpustná.²²

Mechanismus, jakým žlučové soli usnadňují absorpci intranasálních léčiv nebyl ještě úplně objasněn, ale zdá se, že se jedná o kombinaci několika postupů. Zřejmě tvoří dočasné vodní póry v buněčné membráně (transcelulární transport) tvorbou iontových párů mezi záporně nabitými žlučovými solemi a kladně nabitými zbytky peptidů, což jim poskytuje větší lipofilitu a zvyšují permeabilitu membrán a chelatací vápníkových iontů v oblasti těsných spojů otevírají těsné spoje tvorbou dočasných mezibuněčných pórů (paracelulární transport). Dalším potenciálním mechanismem může být snížení viskozity a elasticity hlenu a tím usnadnění penetrace hlenové vrstvy a inhibice enzymatického odbourávání v nosní sliznici.²²

Běžně užívané soli jsou cholát sodný, deoxycholát sodný, glykocholát sodný, taurocholát sodný, taurodeoxycholát sodný a glykodeoxycholát sodný. Maximální zvýšení hladiny insulínu v plazmě bylo dosaženo při použití deoxycholátu, následované chenodeoxycholátem a cholátem při koncentraci 1% w/v.³⁷

Ve studii na zdravých dobrovolnících s přípravkem obsahujícím insulin a 1% glykocholát sodný bylo pozorováno znatelné snížení hladiny glukózy a pozitivní vztah mezi maximální hladinou insulinu a aplikovanou dávkou insulinu.⁴⁸

Studie účinnosti a opakovatelného podání intranasálně podaného insulinu byla provedena na zdravých a diabetických pacientech ve formě aerosolu insulin-deoxycholát. Hladina nosního insulinu v krvi byla ve srovnání s i.v. podáním asi 10%.⁴⁸

Některé studie naznačují, že žlučové soli jsou dobrými látkami k usnadnění nosní absorpce, přesto se vyskytují zprávy naznačující, že žlučové soli mohou v koncentracích nad 0,3% působit podráždění.⁴⁸

Bylo prokázáno, že žlučové soli disociují oligomery insulinu na monomery. Tento efekt zlepšuje průchod membránou, ale může také snižovat fyzikální stabilitu a zvyšovat náchylnost insulinu k enzymatickému odbourávání.⁴⁰

Fosfolipidy

Fosfolipidy jsou povrchově aktivní látky s amfifilním charakterem, přítomné v biologických membránách a liposomech. Mají podobné vlastnosti jako cholin, který můžeme nalézt téměř ve všech orgánech lidského těla.⁵⁶

Lysofosfatidylcholin (LPC) byl v několika studiích schopen zlepšit intranasální vstřebávání insulinu u potkanů a lidského růstového hormonu u potkanů, králíků a ovcí.⁴⁸

Didekanoyl-L-fosfatidylcholin byl použit jako látka usnadňující absorpci intranasálně podaného insulinu u lidských dobrovolníků. Bylo pozorováno, že insulin byl absorbován v závislosti na velikosti dávky s mírným nebo žádným podrážděním.²¹

Syntetické tenzidy

Přídavek 1% neionogenního polyoxyethylen-9-lauryletheru (Laureth-9) zvýšil absorpci intranasálně podaného insulinu ve formě aerosolu u pacientů s diabetem i u zdravých dobrovolníků. Stupeň hypoglykémie byl závislý jak na koncentraci tenzidů,

tak na dávce insulínu. Laureth-9 je však také účinným hemolytickým činidlem a v 0,3% koncentraci způsobuje rychlou a ireversibilní cilioinhibici, takže není vhodný jako látka usnadňující absorpci.²²

Tenzidy často reagují s insulínem nepředvídatelným způsobem. Měření entalpie vazby mezi alkylsulfátem a insulínem ukázalo vysoký stupeň vazby těchto anionických tenzidů na insulín.⁴⁰

10.3.9 Nerozpustné práškové přípravky

Práškové přípravky využívající ve vodě nerozpustné sloučeniny se ukázaly jako efektivní nosiče léčiv zlepšující jejich biologickou dostupnost. Přípravky obsahující CaCO_3 zlepšily nosní absorpci elcatoninu a dalších léčivých látek s širokým rozpětím molekulových hmotností zvýšením rezidenčního času a zvýšením povrchové koncentrace léčivé látky připojením na částice prášku. Přípravky obsahující nerozpustné prášky by mohly zlepšit compliance pacientů v případě, že mají přípravky nepříjemnou chuť. Bezpečnost těchto látek ještě nebyla ve studiích ověřována.⁵⁷

10.4 Částicové systémy

Tyto systémy pro doručování léčiv pomáhají kontrolovat míru transportu léčiv z nosní dutiny a chrání léčivo před enzymatickým rozkladem nosním hlenem. Mohou zlepšit absorpci léčivé látky tím, že prodlužují čas, po který zůstává léčivo v nosní dutině, a tak se prodlužuje doba, po kterou je léčivo v kontaktu s nosní sliznicí.⁵⁸

10.4.1 Liposomy

Liposomy jsou malé, syntetické dvouvrstvé měchýřky kulovitěho tvaru, které mohou být tvořeny z přírodních, netoxických fosfolipidů a cholesterolu. Liposomy jsou slibné systémy pro podávání léčiv díky jejich velikosti, hydrofilnímu i hydrofobnímu charakteru, stejně jako biologické kompatibilitě. Jejich unikátní amfifilní charakter z nich tvoří vhodné systémy pro různé strategie při podávání léčiv. Liposomy můžeme rozdělit do tří skupin podle velikosti a počtu dvouvrstev. Malé monolamelární měchýřky (SUV) o průměru 25-50 nm jsou obklopeny jednou

vrstvou lipidů s vodným roztokem v jádře. Velké monolamelární měchýřky (LUV) mají v průměru 100-3000 nm a tvoří heterogenní skupinu měchýřků obklopených jednou vrstvou lipidů. Vícevrstevné měchýřky (MLV) se skládají z několika vrstev lipidů oddělených od sebe navzájem vodnou vrstvou.⁹

Výběr složek dvouvrstvy určuje tekutost a náboj dvouvrstvy. Např. nenasycený fosfatidylcholin získaný z přírodních zdrojů (vaječný nebo sójový fosfatidylcholin) tvoří tekutou, mnohem více prostupnou a méně stabilní dvouvrstvu, zatímco nasycené fosfolipidy s dlouhými acylovými zbytky jako dipalmytoylfosfatidylcholin tvoří pevné, spíše neprostupné dvouvrstevné konstrukce. Schopnost zachycovat roztoky se liší podle typu liposomu. Vícevrstevné měchýřky jsou středně účinné při zachycování roztoků, ale malé, jednovrstevné měchýřky jsou mimořádně neúčinné.⁹

U liposomů je známo, že podporují uvolňování zachycených léčiv a v případě nosních léčiv jsou schopné snížit mukociliární transport díky jejich povrchové viskozitě. Působení liposomů na nosní sliznici souvisí s fosfolipidy včleněnými do membrány, které otvírají “nové póry” v paracelulárních těsných spojeních. Do membrány je možno začlenit také mukoadhezivní složky, jako karbopol a chitosan, které udržují přípravek v místě podání a zvyšují tím biologickou dostupnost nosního léčiva.⁹

Účinný systém pro podávání léčiv, založený na liposomálních přístupech, musí splňovat několik specifických požadavků. Za prvé je vyžadována dobrá chemická a biologická stabilita a stabilita v roztocích. Za druhé specifické zacílení vyžaduje strukturní a/nebo chemické změny související s funkčními skupinami začleněnými do lipidové dvouvrstvy jako karbohydráty, protilátky, ligandy, růstové faktory, nebo magnetické nanočástice, zlepšující léčebný efekt.⁹

Mezi nevýhody liposomálních systémů můžeme zahrnout interakce s lipoproteiny, které zvyšují tvorbu volných radikálů, a úplné nasycení imunitního systému. Navíc vykazují liposomy nízkou míru enkapsulace, nízkou stabilitu při uchovávání, problémy při sterilizaci a rychlé uvolňování ve vodě rozpustných léčiv v krvi.⁹

Některé nevýhody lze odstranit použitím komplexů CD-léčivá látka, které jsou navázány v liposomech a kombinují tak výhody jak CD (zvýšení rozpustnosti léčivé látky, tak liposomů (cílené podání léčivé látky).⁴⁹

10.4.2 Mikročástice

Mikročástice jsou pevné částice složené z makromolekulárních látek, které se mohou lišit velikostí v rozmezí 1-1000 μm . Pro nosní podání se využívají mikročástice o velikosti nižší než 180 μm . Mohou být opatřeny obalem (mikrotobolky) nebo bez obalu (mikrosféry). Pro zlepšení nosní absorpce se využívají zejména mikrosféry.⁵⁹

Mikrosféry jsou matricové systémy, u nichž je léčivo rozptýleno uvnitř polymerové matrice. Polymery používané při přípravě mikrosfér musí být biokompatibilní a biologicky odbouratelné a s ohledem na nosní podání musí poskytovat prodloužený kontakt s nosní sliznicí. Mikrosféry nabízejí výhodu ochrany včleněných léčiv před působením enzymů a díky prodlouženému uvolňování léčiv zajišťují žádoucí úroveň koncentrace v krvi.⁹

Mechanismus, jakým mikrosféry zvyšují biologickou dostupnost léčiv, je výsledkem vlastností použitého polymeru. Mukoadhezivní polymery poskytují krátkodobou adhezi mezi mikrosférou a hlenem a/nebo povrchem epitheliálních buněk. Nevykazují systémovou toxicitu. Pokud jsou mukoadhezivní polymery použity k přípravě nosičů léčiv, napomáhají prodloužení residenčního času v nosní dutině, zintenzivňují kontakt mezi nosní sliznicí a léčivem, zvyšují koncentraci léčivé látky v místě uložení a usnadňují průchod léčivé látky tím, že otevírají těsná spojení mezi epitheliálními buňkami.⁹

Mikrosféry byly zkoušeny jako nosní lékové formy s cílem snížit nosní mukociliární transport a tím zvýšit absorpci nosních léčiv. Např. mikrosféry tvořené albuminem, škrobem a dextranem, s průměrem kolem 45 μm , mají poločas transportu 3 hodiny, ve srovnání s 15 minutami u roztoků a práškových přípravků. Tyto mikrosféry absorbují vodu a tvoří gelu podobnou vrstvu, která je odstraňována pomaleji z nosní dutiny.⁹

Nejčastěji užívaným systémem jsou mikrosféry tvořené odbouratelným škrobem (DSM). Koncentrace insulinu podaného v DSM v dávce 1IU/kg dosáhla maximální

hladiny v plazmě za 7-10 minut. Podání vedlo ke snížení hladiny glukózy o 45-50% přibližně 30-40 minut po aplikaci. Odbouratelné škrobové mikrosféry připravované technikou emulzní polymerace, kdy je škrob zesíťován pomocí epichlorohydrinu, jsou známy pod názvem Spherex.⁶⁰

Bezpečnost škrobových mikrosfér byla ověřena několika studiemi. Dobrá tolerance byla dosažena u zdravých lidských dobrovolníků po jednotýdenním podávání.⁹

Systém mikrosfér založený na dextranu zesíťovaném s epichlorohydrinem se používá jako další transportní systém. Tyto mikrosféry jsou na trhu dostupné pod značkou Sephadex a DEAE-Sephadex. V druhém případě je glukózová jednotka v dextranu nahrazena diethylaminoethylovou skupinou. Stupeň zesíťování se liší mezi různými úrovněmi. Mezi stupněm zesíťování a stupněm bobtnání existuje nepřímá úměra. Tudíž objem tekutiny, kterou mikrosféra zadrží ve stavu nabobtnání, je nižší u útvarů s vysokým stupněm zesíťování, než u útvarů s nižším stupněm zesíťování.⁶⁰

U obou systémů, jak škrobového tak dextranového, je léčivo zaváděno do mikrosfér procesem lyofilizace. Vodný roztok léčiva je přidán do mikrosféry, která nasaje tekutinu a vytvoří se gel. Gel je potom mrazově vysušen a výsledný prášek se nechá prosít sítí, abychom získali homogenní suchý přípravek.⁶⁰

Ačkoliv je residenční čas v nosní dutině znatelně delší pro mikrosféry, které absorbují vodu při kontaktu se sliznicí a tvoří gel, zdá se, že toto není jediný faktor, jakým je ovlivněna absorpce velkých hydrofilních léčiv. Mechanismus zvýšení absorpce léčivých látek podaných s odbouratelnými škrobovými mikrosférami byl ukázán na jejich účinku na těsná spojení mezi epitheliálními buňkami. V transmisním elektronovém mikroskopu byly zkoumány Caco-2 buňky v monovrstvě před podáním, ihned po podání, 15 minut a 180 minut po podání práškových mikrosfér. Bylo zřetelně vidět, že se těsná spojení začala oddalovat po 3 minutách a ještě po 15 minutách oddalování pokračovalo.⁶⁰

Předpokládá se, že nosní sliznice je v přítomnosti mikrosfér dehydratovaná, protože škrob jí odnímá vodu a bobtná. Výsledkem je oddálení mezibuněčných spojů, které zvyšuje absorpci léčivé látky. Po 3 hodinách byla velikost těsných spojů srovnatelná

s kontrolním vzorkem, což ukazuje na to, že usnadňující efekt odbouratelných škrobových mikrosfér je rychlý a reversibilní.⁶⁰

Tato pozorování jsou ve shodě s rychlou absorpcí insulínu a normalizace glykémie pozorované u zvířat po podání insulínu s odbouratelnými škrobovými mikrosférami. Pro optimální účinek by měla být léčivá látka dostupná pro absorpci, tzn. rozpuštěná, když částice bobtnají odnímáním vody z vrstvy hlenu a pod ním ležících epitheliálních buněk a otvírají se tak dočasně těsná spojení. Potvrzením tohoto mechanismu působení je ztráta účinku v případě, že použité mikrosféry jsou ve předbobtnaném stavu.⁶⁰

Ve studii využívající DEAE-dextranové mikrosféry o velikosti nižší než 45 µm byla zkoumána biologická dostupnost insulínu v dávce 1 IU/kg u potkanů. Pokud byl insulín navázán na povrchu mikrosfér, byl ověřen pokles hladiny glukózy o 52% asi 30 minut po podání. Pokud byl insulín navázán uvnitř mikrosféry v matrix, bylo dosaženo maximálního poklesu hladiny glukózy o 30% za 60 minut po podání. Mikrosféry musí úplně nabobtnat, aby došlo k uvolnění celého množství navázaného insulínu. Omezené množství tekutiny v nosní dutině vede k neúplnému bobtnání. To znamená, že uvolněné množství insulínu navázaného uvnitř matrix mikrosfér je více ovlivněno touto skutečností než množství insulínu vázaného na povrchu mikrosféry.⁶⁰

Na modelu ovce byla zkoumána biologická dostupnost biosyntetického lidského růstového hormonu a desmopresinu. Relativní biologická dostupnost hGH byla 3% po podání v odbouratelných škrobových mikrosférách a 14%, pokud bylo použito lysofosfatidylcholinu. Maximální plazmatické koncentrace v plazmě bylo dosaženo 120 minut po podání v DSM a 60 minut po podání v mikrosférách v kombinaci s lysofosfatidylcholinem. Oddálení maxima v plazmě bylo připsáno nízké rozpustnosti hGH. Přidáním lysofosfatidylcholinu zřejmě došlo ke zvýšení rozpustnosti a maximální koncentrace v plazmě bylo dosaženo dříve. Desmopresin byl absorbován rychleji s maximem v plazmě dosaženým za 8 minut v samotných DSM a 18 minut v mikrosférách kombinovaných s LPC. Biologická dostupnost byla 5 resp. 10%.⁶⁰

Ve studii in vitro využívající k intranasálnímu podávání peptidových léčiv mikrosféry tvořené aminoderivátem želatiny se ukázalo, že se insulin uvolňuje pomaleji než z mikrosfér tvořených přírodní želatinou. Mikrosféry byly podávány potkanům ve formě prášku a suspenze. Absolutní biologická dostupnost po intranasálním podání přípravků obsahujících 5 IU insulinu byla znatelně vyšší u práškové formy. Bylo prokázáno, že práškové mikrosféry odebírají vodu z nosní sliznice, což následně vede k dehydrataci epitheliální membrány a k otevření těsných spojů.⁶

Mikrosféry s insulinem připravené z kyseliny hyaluronové poskytly významný vzrůst absorpce u ovcí. Relativní biologická dostupnost ve srovnání s s.c. podáním byla 11%. Tato studie ukázala, že mikrosféry z kyseliny hyaluronové mají odlišné vlastnosti než mikrosféry škrobové, a přesto poskytují srovnatelné zlepšení absorpce insulinu.⁶¹

Dextranové mikrosféry neprokázaly téměř žádný účinek na ciliární frekvenci. Po opakovaném podání DSM nebyly zjištěny žádné změny v mukociliárním transportu a mikrosféry nezpůsobily ani kongesci ani dekongesci.⁶⁰

V případě nosního podávání se je třeba vyhnout nežádoucímu účinku mikrosfér navolání slizniční imunitní odpovědi.⁶⁰

Ve studii používající k aplikaci insulinu u potkanů kladně a záporně nabitě želatinové mikrosféry ukázaly kladně nabitě mikrosféry lepší schopnost přilnout ke sliznici a zároveň chránily kalcitonin před enzymatickým odbouráváním. Hypokalcemický efekt získaný po podání mikrosfér byl zřetelně vyšší než u samotného roztoku kalcitoninu.⁶

10.4.3 Nanočástice

Nanočástice jsou pevné koloidní částice složené z makromolekulárních složek o molekulové hmotnosti v rozmezí 10-1 000 nm. Léčivo může být v nanočástici rozpuštěné, zachycené, adsorbované nebo zapouzdřené. V závislosti na způsobu přípravy mohou být získány nanosféry nebo nanotobolky s různými vlastnostmi a charakteristikou uvolňování včleněného terapeutického činidla. Nanotobolky jsou měchýřkovité systémy, ve kterých je léčivo uzavřeno do dutiny obklopené

jednoduchou polymerovou membránou, zatímco nanosféry jsou matricové systémy, ve kterých je léčivo pomocí fyzikálních sil rovnoměrně rozptýleno.⁹

Polymery používané k tvorbě nanočástic zahrnují syntetické polymery jako kopolymer kyseliny polymléčné a polyglykolové, polyakryláty a polykapronolaktony nebo přírodní polymery, jako jsou albumin, želatina, alginát, kolagen a chitosan. Syntetické polymery byly testovány na toxicitu a bezpečnost v rozsáhlých studiích na zvířatech a jsou běžně používány u lidí, zatímco přírodní polymery nejsou tak široce rozšířené díky tomu, že se liší v čistotě a často vyžadují zesíťování, což může poškodit uložené léčivo.⁹

Chitosan je považován za nejbezpečnější a nejúčinnější látku usnadňující absorpci, má bioadhezivní vlastnosti, takže jsou chitosanové nanočástice rozsáhle studovány jako nosiče pro intranazální podávání insulínu. Usnadnění absorpce se dá vysvětlit tak, že kladně nabitě chitosanové nanočástice mohou zesílit kontakt mezi insulínem a nosní sliznicí, což vede ke zvýšení koncentrace insulínu v místě absorpce. Dalšího zlepšení vlastností chitosanových nanočástic lze dosáhnout modifikacemi jejich povrchu.⁴⁵

Kopolymer polyethylenglykolu (PEG) a chitosanu může zvýšit rozpustnost a zlepšit biologickou kompatibilitu chitosanu. Modifikace chitosanu pomocí PEG může zabránit díky sterickým repulzním mechanismům adsorpci proteinů plazmy, pokud se nanočástice dostanou do kontaktu s krví. Intranazální podání insulínu uloženého v nanočásticích PEG s chitosanem usnadňuje absorpci insulínu ve větším rozsahu než suspenze složené z insulínu a kopolymeru PEG s chitosanem a kontrolní roztok insulínu.⁶²

Chitosanové nanočástice byly zkoumány jako prostředky pro nosní podávání peptidů. Modelovou složkou byl insulín. Bylo zjištěno, že suspenze chitosanových nanočástic byla schopná zlepšit nosní absorpci insulínu ve větší míře než roztok chitosanu. Pravděpodobný mechanismus tohoto chování je ten, že nanočástice přilne k nosní sliznici a přechodně otevře těsná spojení a tím usnadní transport insulínu připojeného k slizničnímu povrchu. Při pokusech na králících byly tyto nanočástice schopny prokazatelně zvýšit hypoglykemizující odpověď na transnasálně

absorbovaný insulin. Koloidní systém nanočástic je získáván různými metodami zahrnujícími mj. zesíťování, srážení nebo iontové interakce mezi pozitivně nabitým chitosanem a negativně nabitým polymerem.⁹

V různých publikacích bylo zaznamenáno, že chitosanové nanočástice připravované iontovou gelační metodou jsou schopné zvýšit nosní absorpci insulinu, který byl na ně navázán. Ta se následně projeví u králíků rozsáhlejším snížením hladiny glukózy v plazmě, než jakým by se dosáhlo s roztokem insulin-chitosan.

Různé koncentrace chitosanu použité pro syntézu nanočástic zlata ukázaly, že při vyšší koncentraci chitosanu (0,1%w/v) byly nanočástice stabilní a nedošlo k žádným známkám shlukování. Nanočástice také vykazovaly prodlouženou stabilitu po dobu 6 měsíců. 2 hodiny po podání těchto nanočástic obsahujících insulin u potkanů byl změřen pokles hladiny glukózy o 20,27%. Molekuly zlata zlepšily povrchové vlastnosti nanočástic pro lepší navázání léčivé látky.⁶³

10.5 Bioadhezivní systémy

Rychlý mukociliární transport léčivých přípravků, které jsou podávány do nosní dutiny, je považován za důležitý faktor způsobující nízkou biologickou dostupnost intranasálně podávaných léčiv.²² Bioadhezivní látky prodlužují residenční čas molekuly léčiva a tím zvyšují absorpci a biologickou dostupnost nasálně podávaných léčiv. Bioadheze je schopnost syntetických nebo přírodních materiálů ulpívat na biologických tkáních nebo membránách po prodloužené období. Pokud je biologická tkáň pokryta hlenem, jedná se o mukoadhezivní systém.²⁷

Protože je velmi těžké dosáhnout dostatečného účinku makromolekulárních léčiv jen díky prodloužení retenčního času v nosní dutině, jsou bioadhezivní systémy kombinovány s penetračními enhancery.⁴⁵

10.5.1 Mukoadhezivní prášky

Mukoadheze může být jednoduše dosažena použitím bioadhezivních pomocných látek jako je chitosan, hydroxypropylcelulosa, hydroxypropylmethylcelulosa, mikrokrytalická celulosa, škrob a karbopol. Mukoadhezivní prášky jsou zajímavé, protože zvyšují residenční čas léčiva v nosní dutině, zlepšují kontakt mezi sliznicí a

lécivem, zvyšují koncentraci léčiva v místě depozice a usnadňují prostup léčivé látky přes sliznici tím, že otevírají těsné spoje mezi epitheliálními buňkami.⁴⁵

Biologická dostupnost intranasálně podaného insulinu dosažená u králíků po jednom podání bioadhezivního přípravku složeného ze sprejově sušené směsi Amioca škrobu a Carbopolu 974P(1/3) nebo fyzikální směsi bubnově sušeného kukuřičného škrobu a Carbopolu 974P(9/1) přesáhla 10%. Opakované podávání bioadhezivních prášků však způsobilo výrazné snížení biologické dostupnosti insulinu a menší snížení hladiny glukózy. Snížení biologické dostupnosti bylo způsobeno zejména vysokou viskozitou bioadhezivních prášků v nosním hlenu, což způsobuje fyzikální překážku absorpce a silně zpomaluje nosní transport.⁶⁴

Biologickou dostupnost insulinu je také možno zvýšit společným působením mukoadhezivního polymeru a permeačního enhanceru. Ve studii probíhající na králících se ukázalo zlepšení absorpce nosního insulinu po podání mikrokrytalické celulózy v kombinaci s glycyrrhizínátem amonným jako enhancerem. A ačkoliv bylo zlepšení absorpce po podání mikrokrytalické celulózy s taurocholátem sodným méně přesvědčivé, je zapotřebí brát v úvahu i působení samotného enhanceru.⁶⁵

10.5.2 Mukoadhezivní gely

Použití bioadhezivních nosních gelů nejen napomáhá prodloužení kontaktu mezi léčivem a místem absorpce v nosní dutině, ale usnadňuje přímo i absorpci léčiva přes nosní sliznici.⁴⁵

Studie využívající insulin ve formě gelu připraveného kombinací carbopolu a hydroxypropylmethylcelulosy jako gelujících činidel ukázala, že absorpce léčivé látky přes nosní sliznici byla vysoká v průběhu 0,5-1,5 hodiny s jasným poklesem hladiny glukózy a zvýšením plazmatické koncentrace insulinu.⁶⁶

U potkanů byla zkoumána nosní absorpce kalcitoninu a insulinu v kombinaci s polyakrylovou kyselinou. Bylo zjištěno, že nosní absorpce byla vyšší u gelu s 0,15% (w/v) polyakrylové kyseliny než u 1% (w/v) gelu.²¹

Insulin-chitosanový gel s EDTA jako látkou usnadňující absorpci při intranasálním podání průkazně zvyšuje absorpci insulinu a snižuje hladinu glukózy v plazmě o

46% ve srovnání s intravenózním způsobem podání. I toto může být vhodný způsob v kontrolovaném podání léčiv.⁶⁷

Termosenzitivní hydrogely mohou být nakapány nebo vstříknuty jednoduše do nosní dutiny. Ve formě roztoku se snáze rozprostřou na nosní sliznici a při teplotě těla se roztok změní ve viskózní hydrogel, což vede ke snížení mukociliárního transportu a pomalejšímu uvolňování léčivé látky.⁴⁵

11 Závěr

Transnasální aplikace peptidů se stala jedním z nejvíce sledovaných, neinvazivních způsobů podání těchto látek. S výjimkou několika přípravků uvedených na trh v poslední době zůstává totiž jedinou možností, jak aplikovat peptidická léčiva, podkožní podání.

Ve srovnání s jinými způsoby podání poskytuje transnasální aplikace několik výhod při dosahování odpovídající biologické dostupnosti. Nosní sliznice zabírá rozsáhlou plochu využitelnou pro absorpci, porózní endotheliální membrána je relativně dobře prostupná, enzymatická aktivita je zde nižší než v trávicím traktu a vysoce vaskularizovaná lamina propria umožňuje přímou absorpci léčivé látky do systémového oběhu, čímž se vyhýbá jaternímu first-pass metabolismu. Nosní sliznice je snadno dostupná, takže si pacient při dlouhodobé terapii může aplikovat lék sám. Navíc je možné napodobit farmakokinetický profil endogenní sekrece u zdravých lidí.

Na druhou stranu stále existují překážky, které brání dostatečné absorpci peptidů přes nosní sliznici. Největším omezením ve snaze dosáhnout dostatečné biologické dostupnosti terapeuticky užívaných proteinů a peptidů je jejich nízká prostupnost nosní sliznicí. Další příčinou nízké absorpce je rychlá eliminace léčiva z nosní dutiny působením mukociliárního transportu, což zkracuje čas, po který může být léčivá látka absorbována přes nosní sliznici. Třetím faktorem, který přispívá k nízké biologické dostupnosti peptidů, je možnost jejich enzymatického rozkladu. Nosní dutina obsahuje velké množství různých druhů enzymů jako monooxygenázy, reduktázy, transferázy, esterázy a proteolytické enzymy.

Při vývoji nových léčivých přípravků obsahujících peptidové léčivé látky je zapotřebí tyto překážky překonat. Ke zlepšení nosní absorpce je možné použít jeden nebo více následujících postupů.

Metabolickou stabilitu peptidům poskytují různé chemické modifikace primární struktury nebo tvorba proléčiv. Pro transnasální aplikaci peptidů nejsou tyto postupy příliš prostudované, navíc se zdá, že chemické modifikace mohou být úspěšné u

malých molekul, ale z důvodu složité struktury peptidů se nehodí pro úpravu velkých molekul.

Ochranu před enzymatickým rozkladem může poskytnout také společné podání peptidového léčiva s některým z inhibitorů nosních enzymů. Inhibitory enzymů však nejsou schopny usnadnit prostup léčivé látky buněčnou membránou. Dále ovlivňují normální metabolické procesy v těle, což vede k projevu nežádoucích vedlejších účinků, takže se tento způsob ovlivnění nosní absorpce nezdá příliš výhodný, efektivní ani bezpečný.

Vliv na prostupnost léčivé látky přes buněčnou membránu mají látky usnadňující absorpci, tzv. enhancery. Jedná se o nejčastější způsob ovlivnění nosní absorpce. V tomto směru je studováno velké množství sloučenin počínaje jednoduchými anorganickými sloučeninami, přes žlučové kyseliny a jejich deriváty, kationické polymery až po peptidy měnící některé vlastnosti membrán. Většina těchto látek však způsobuje v koncentracích používaných při výzkumu léčivých přípravků podráždění nebo poškození nosní sliznice.

Prodloužení času, po který setrvává léčivo v nosní dutině a ochranu léčivých látek před nepříznivým prostředím nosní dutiny poskytují částicové systémy, které zároveň mohou zlepšovat nosní absorpci a ovlivňovat rychlost uvolňování léčivé látky z těchto systémů. Částicové systémy prodlužují dobu kontaktu léčivé látky s nosní sliznicí a otevíráním těsných spojů usnadňují absorpci.

Z velkého množství studií vyplývá, že nejslibnější metodou je použití bioadhezivních částicových systémů založených na polymerové bázi společně s látkami usnadňujícími absorpci. Je zapotřebí provést další studie se zaměřením na zvýšení bezpečnosti a efektivity používaných sloučenin.

V přehledu je možné shrnout, že transnasální podání léčivých přípravků je vhodnou aplikační cestou pro malé molekuly léčivých látek, které snadno procházejí nosní sliznicí i bez použití enhancerů nebo jiných metod zvyšujících absorpci. Pro peptidová a proteinová léčiva se tento způsob podání jeví zatím jako omezeně vhodný z důvodu velkého množství faktorů, které ovlivňují transnasální absorpci těchto látek.

12 Použitá literatura

¹ MITRA, A.K.:Overcoming the molecular weight barrier: Approaches to enhance transepithelial transport, k 9.5.2011.

http://www.aapspharmaceutica.com/workshops/NasalPulmonaryDelivery060905/Mitra_June8-9_05.pdf

² BEHL, R.C., PIMPLASKAR, H.K., SILENO, A.P. et al.: Effects of physiochemical properties and other factors on systemic nasal drug delivery, *Adv. Drug Del. Rev.*, 1998, 29, s. 89-116.

³ UGWOKÉ, M.I., AGU, R.U., VERBEKE, N. et al.: Nasal mucoadhesive drug delivery: Background, applications, trends and future perspectives, *Adv. Drug Del. Rev.*, 2005, 57, s. 1640-1665.

⁴ CHUGH, Y., KAPOOR, P., KAPOOR, A.K.:Intranasal drug delivery: a novel approach, *Indian J. Otolaryngo.l Head Neck Surg.*, April-June 2009, 61, s. 90-94.

⁵ CARSTEN E., KWANG-JIN K. (Eds.): Drug absorption studies. 2008, Springer US, New York, 696s., ISBN 978-0-387-74900-6. DAE-DUK, K.: In vitro cellular models for nasal drug absorption studies, s. 216-234.

⁶ OZSOY, Y., GUNGOR, S., CEVHER, E.: Nasal delivery of high weight drugs, *Molecules*, 2009, 14, s. 3754-3779.

⁷ GONZALES-MARISCAL, L. (Ed.): Tight junctions, 2006, Springer, Georgetown, 224 s., ISBN 978-0-387-33201-7. SALAMA, N.N., EDDINGTON, N.D., FASANO, A.: Tight junction modulation and its relationship to drug delivery, s. 206-219.

⁸ SCHAEFER, M.:Barrier forming tissue, k 11.4.2011

<http://www.nanoanalytics.com/en/hardwareproducts/cellzscope/howitworks/chapter01/index.php>.

⁹ MAINARDES, R.M.,URBAN, M.C.C., CINTO, P.O. et al.: Liposomes and micro/nanoparticles as colloidal carriers for nasal drug delivery, *Curr. Drug Delivery*, 2006, 3, s. 275-285.

-
- ¹⁰ HUSSAIN, A.A.: Intranasal drug delivery, *Adv. Drug Del. Rev.*, 1998, 29, s. 39-49.
- ¹¹ SCHMIDT, M.CH., PETER, H., LANG, S.R. et al.: In vitro cell models to study nasal mucosal permeability and metabolism, *Adv. Drug Del. Rev.*, 1998, 29, s. 51-79.
- ¹² GAD, S.C. (Ed.): *Pharmaceutical Manufacturing Handbook Production and Processes*, 2008, John Wiley&Sons Inc., Hoboken, New Jersey, 1370 s., ISBN 978-0-470-25958-0. CHANDAN, T., FAKHRUL, A.: Nasal delivery of peptide and nonpeptide drugs, s. 591-650.
- ¹³ CARSTEN, E., KWANG-JIN, K. (Eds.): *Drug Absorption Studies*, 2008, Springer US, New York, 698 s., ISBN 978-0-387-74900-6. AGU R.U., UGWOKÉ M.I.: In situ and ex vivo nasal models for preclinical drug development studies, s. 112-134.
- ¹⁴ HARKEMA, J.R., CAREY, S.A., WAGNER, J.G.: The nose revisited: A brief review of the comparative structure, function, and toxicologic pathology of the nasal epithelium, *Toxicol. Pathol.*, 2006, 34, s. 252-269.
- ¹⁵ WIKIPEDIA: Nasal cavity, k 13.4.2011, http://www.ask.com/wiki/Nasal_cavity.
- ¹⁶ ZUBAEROVA, D.Kh., LARIONOVA, N.I.: Noninvasive insulin delivery systems, *Biochemistry-Moscow*, 2008, 2(4), s. 346-355.
- ¹⁷ MORALES, C.R.: Lecture 32. Histology of the Respiratory System 1, k 10.5.2011 http://alexandria.healthlibrary.ca/documents/notes/bom/unit_2/L-32%20Histology%20of%20the%20Respiratory%20System%201.xml.
- ¹⁸ ČIHÁK, R., GRIM, M. (Eds.): *Anatomie 2*, 2002, Grada Publishing, Praha, 488s., ISBN 80-2247-0143-X. ČIHÁK, R.: *Systema respiratorium-System dýchací*, s. 170-243.
- ¹⁹ MYGIND, N., DAHL, R.: Anatomy, physiology and function of the nasal cavities in health and disease, *Adv. Drug Del. Rev.*, 1998, 29, s. 3-12.
- ²⁰ MARTIN, E., SCHIPPER, N.G.M., VERHOEF, J.C. et al.: Nasal mucociliary clearance as a factor in nasal drug delivery, *Adv. Drug Del. Rev.*, 1998, 29, s. 13-38.
- ²¹ MOZAFARI, M.R. (Ed.): *Nanomaterials and nanosystems for biomedical applications*, 2007, Springer, 168 s., ISBN 978-1-4020-6288-9. OZER, A.Y.: Alternative applications for drug delivery: nasal and pulmonary routes, s. 99-112.

-
- ²² HINCHCLIFFE, M., ILLUM, L.: Intranasal insulin delivery and therapy, *Adv. Drug Del. Rev.*, 1999, 35, s. 199-234.
- ²³ KHARENKO, E.A., LARIONOVA, N.I., DEMINA, N.B.: Mucoadhesive drug delivery systems (review), *Pharm. Chem. J-USSR*, 2009, 43(4), s. 200-208.
- ²⁴ RAHISUDDIN, SHARMA, P.K., GARG, G. et al.: Review on nasal drug delivery system with recent advancement, *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.*, 2011, 3, s. 6-11.
- ²⁵ BARANIUK, J.N., KIM, D.: Nasonasal reflexes, the nasal cycle, and sneez, *Curr Allergy Asthm. R.*, 2007, 7, s. 105-111.
- ²⁶ HANIF, J., JAWAD, S.S.M., ECCLES, R.: The nasal cycle in health and disease, *Clin. Otolaryngol.*, 2000, 25, s. 461-467.
- ²⁷ BHISE, S.B., YADAV, A.V., AVACHAT, A.M., et al.: Bioavailability of intranasal drug delivery system, *Asian Journal of Pharmaceutics*, 2008, october-december, s. 201-215.
- ²⁸ JIAN, L., LI WAN PO, A.: Effects of insulin and nasal absorption enhancers on ciliar activity, *Int. J. Pharm.*, 1993, 95, s. 101-104.
- ²⁹ CONSTANTINO, H.R., ILLUM, L., BRANDT, G. et al.: Intranasal delivery: Physicochemical and therapeutic aspect, *Int. J. Pharm.*, 2007, 337, s. 1-24.
- ³⁰ DONOVAN, D.M., HUANG, Y.: Large molecule and particulate uptake in the nasal cavity: the effect of size on nasal absorption, *Adv. Drug Del. Rev.*, 1998, 29, s. 147-155.
- ³¹ MAROLDI, R., NICOLAI, P. (Eds.): Imaging in treatment planning for sinonasal diseases, 2005, Springer, Verlag Berlin Heidelberg, 304 s., ISBN 3-540-42383-4.
- TOMENZOLI, D.: Physiology of the nose and paranasal sinuses, s. 29-34.
- ³² KUBLIK, H., VIDGREN, M.T.: Nasal delivery systems and their effect on deposition and absorption, *Adv. Drug Del. Rev.*, 29, 1998, s. 157-177.
- ³³ BOEK, W.M., ROMEIJN, S.G., GRAAMANS, K. et al: Validation of animal experiments on ciliary function in vitro. II. The influence of absorption enhancers, preservatives and physiologic saline, *Acta Otolaryngol. (Stockh)*, 1999, 119, s. 98-101.

-
- ³⁴ PONTIROLI, A.E.: Peptide hormones: review of current and emerging uses by nasal delivery, *Adv. Drug Del. Rev.*, 1998, 29, s. 81-87.
- ³⁵ BONDAREVA, V.M., CHISTYAKOVA, O.V.: Insulin and insulin-receptor signaling in the brain, *Neurochem. J.*, 2007, 1(3), s. 176-187.
- ³⁶ WALSH, G.: Therapeutic insulins and their large-scale manufacture, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2005, 67, s. 151-159.
- ³⁷ SHAIKH, I.M., JADHAV, K.R., GANGA, S. et al.: Advanced approaches in insulin delivery, *Curr. Pharm. Biotechnol.*, 2005, 6, s. 387-395.
- ³⁸ RUNGBY, J., BROCK, B., SCHMITZ, O.: New strategies in insulin treatment: analogues and noninvasive routes of administration, *Fundam. Clin. Pharm.*, 2004, 19, s. 127-132.
- ³⁹ HEINEMANN, L., PFÜTZNER, A., HEISE, T.: Alternatives routes of administration as an approach to improve insulin therapy: update on dermal, oral, nasal and pulmonary insulin delivery, *Curr. Pharm. Desing*, 2001, 7, s. 1327-1351.
- ⁴⁰ SANDERS, L. M., HENDREN, R. W. (Eds.): Protein delivery: Physical systems, 1997, Plenum Press, New York, 433s., ISBN 0-306-45359-2, BRANGE, J., LANGKJÆR, L.: Insulin formulation and delivery, s. 343-386.
- ⁴¹ PEPPAS, N.A., CARR, D.A.: Impact of absorption and transport on intelligent therapeutics and nanoscale delivery of protein therapeutics agents, *Chem. Eng. Sci.*, 2009, 64, s. 4553-4565.
- ⁴² HILSTED, J., MADSBAD, S., HVIDBERG, A. et al.: Intranasal insulin therapy: the clinical realities, *Diabetologia*, 1995, 38, s. 680-684.
- ⁴³ LALEJ-BENNIS, D., BOILLOT, J., BARDIN, C. et al.: Efficacy and tolerance of intranasal insulin administered during 4 months in severely hyperglycaemic type 2 diabetic patients with oral drug failure: a cross-over study, *Diabet. Med.*, 2001, 18, s. 614-618.
- ⁴⁴ YU, S., ZHAO, Y., WU, F. et al.: Nasal insulin delivery in the chitosan solution: in vitro and in vivo studies, *Int. J. Pharm.*, 2004, 281, s.11-23.
- ⁴⁵ DUAN X., MAO S.: New strategies to improve the intranasal absorption of insulin, *Drug Discov. Today*, June 2010, 15, s. 416-427.

-
- ⁴⁶ KRISHNAMOORTHY, R., MITRA, A.K.: Prodrugs for nasal drug delivery, *Adv. Drug Del. Rev.*, 1998, 29, s. 135-146.
- ⁴⁷ ZHOU, X.H.: Overcoming enzymatic and absorption barriers to non-parenterally administered protein and peptide drugs, *J. Control. Release*, 1994, 29, s. 239-252.
- ⁴⁸ BEHL, C.R., PIMPLASKAR, H.K., SILENO, A.P. et al.: Optimization of systemic nasal drug delivery with pharmaceutical excipients, *Adv. Drug Del. Rev.*, 1998, 29, s. 117-133.
- ⁴⁹ VYAS, A., SARAF, S., SARAF, S.: Cyclodextrin based novel drug delivery systems, *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.*, 2008, 62, s. 23-42.
- ⁵⁰ MERKUS, F.W.H.M., VERHOEF, J.C., MARTIN, E. et al.: Cyclodextrins in nasal drug delivery, *Adv. Drug Del. Rev.*, 1999, 36, s. 41-57.
- ⁵¹ DYER, A.M., HINCHCLIFFE, P., WATTS, P. et al.: Nasal delivery of insulin using novel chitosan based formulations: A comparative study in two animal models between simple chitosan formulations and chitosan nanoparticles, *Pharm. Res.*, 2002, 7, s. 998-1008.
- ⁵² DAVIS, S.S., ILLUM, L.: Absorption enhancers for nasal drug delivery, *Clin. Pharmacokinet.*, 2000, 13, s. 1107-1128.
- ⁵³ OHTAKE, K., MAENO, T., UEDA, H. et al.: Poly-L-arginine predominantly increases the paracellular permeability of hydrophilic macromolecules across rabbit nasal epithelium in vitro, *Pharm. Res.*, 2003, 2, s. 153-160.
- ⁵⁴ BELTING, M., WITTRUP, A.: Macromolecular drug delivery: basic principles and therapeutic applications, *Mol. Biotechnol.*, 2009, 43, s. 89-94.
- ⁵⁵ KHAFAGY, El-S., MORISHITA, M., ISOWA, K. et al.: Effect of cell-penetrating peptides on the nasal absorption of insulin, *J. Control. Release*, 2009, 133, s. 103-108.
- ⁵⁶ TÜRKER, S., ONUR, E., ÖZER, Y.: Nasal route and drug delivery systems, *Pharm. World Sci.*, 2004, 26, s. 137-142.

-
- ⁵⁷ ISHIKAWA, F., MURANO, M., HIRAISHI, M. et al.: Insoluble powder formulation as an effective nasal drug delivery system, *Pharm. Res.*, 2002, 19, s. 1097-1104.
- ⁵⁸ KHAFAGY, El-S., MORISHITA, M., ONUKI, Y. et al.: Current challenges in non-invasive insulin delivery system: a comparative review, *Adv. Drug Del. Rev.*, 2007, 59, s. 1521-1546.
- ⁵⁹ KOMÁREK, P., RABIŠKOVÁ, M.(Eds): Technologie léků, 2006, Galén, Praha, 399 s., ISBN 80 7262 423 7, CHALABALA, M., RABIŠKOVÁ, M., CHALUPOVÁ, Z. et al.: Léky jako aplikační systémy, s. 191-310.
- ⁶⁰ PERESWETOFF-MORATH L.: Microspheres as nasal drug delivery systems, *Adv. Drug Del. Rev.*, 1998, 29, s. 185-194.
- ⁶¹ ILLUM, L., FARRAJ, N.F., FISHER, A.N. et al.: Hyaluronic acid ester microspheres as a nasal delivery system for insulin, *J. Control. Release*, 1994, 29, s. 133-141.
- ⁶² ZHANG, X., ZHANG, H., WU, Z. et al.: Nasal absorption enhancement of insulin using PEG-grafted chitosan nanoparticles, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 2008, 68, s. 526-534.
- ⁶³ BHUMKAR, D.R., JOSHI, H.M., SASTRY, M. et al.: Chitosan reduced gold nanoparticles as novel carriers for transmucosal delivery of insulin, *Pharm. Res.*, 2007, 24, s. 1415-1426.
- ⁶⁴ CALLENS, C., PRINGELS, E., REMON, J.P.: Influence of multiple nasal administrations of bioadhesive powders on the insulin bioavailability, *Int. J. Pharm.*, 2003, 250, s. 415-422.
- ⁶⁵ DONDETI, P., ZIA, H., NEEDHAM, T.E.: In vivo evaluation of spray formulation of human insulin for nasal delivery, *Int. J. Pharm.*, 1995, 122, s. 91-105.
- ⁶⁶ D'SOUZA, R., MUTALIK, S., VANKATESH, M. et al.: Nasal insulin gel as an alternate to parenteral insulin: formulation, preclinical, and clinical studies, *AAPS PharmSciTech*, 2005, 6(2), s. E184- E189.
- ⁶⁷ VARSHOSAZ, J., SADRAI, H., HEIDARI, A.: Nasal delivery of insulin using bioadhesive chitosan gels, *Drug. Deliv.*, 2006, 13, s.31-38.